



**Universidade de  
Aveiro  
2013**

Departamento de Biologia

**Diana Carla Salzedas  
Lopes**

**EFEITO DA CARGA DO  
FOTOSENSIBILIZADOR EM LÍPIDOS DE  
*ESCHERICHIA COLI***



Universidade de  
Aveiro  
2013

Departamento de Biologia

Diana Carla Salzedas  
Lopes

## **EFEITO DA CARGA DO FOTOSSENSIBILIZADOR EM LÍPIDOS DE *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE), à Unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296) e CESAM (project Pest-C/MAR/LA0017/2013).



**o júri**

**Prof. Dra. Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**  
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro  
(Presidente)

**Prof. Dra. Maria Manuel Silva Oliveira**  
Professora auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro  
(Arguente)

**Prof. Dra. Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues**  
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro  
(Coorientadora)

## **agradecimentos**

Dedico este espaço para expressar, o meu mais sincero agradecimento a algumas pessoas que marcaram este meu percurso.

Quero em primeiro lugar agradecer em toda a extensão da palavra “obrigada” à professora Rosário Domingues, por ter sido muito mais que uma coorientadora. Agradeço todo o conhecimento transmitido e a admirável proeza de conseguir aliar o excelente profissionalismo com a parte boa das relações humanas, e ser uma amiga assim como a principal fonte contagiante de positivismo ao longo destes últimos meses.

À professora Adelaide Almeida, pela motivação, exigência, e enorme profissionalismo que transmitiu ao longo do meu trabalho.

Aos meus pais, Luis e Minda, não existem palavras suficientes para lhes agradecer. Obrigada por estarem sempre do meu lado, por serem meus pilares, meus admiradores secretos e os principais responsáveis pela pessoa em que me tornei.

Aos meus irmãos, Simão e Miguel porque, mesmo que involuntariamente, me ensinaram a arte de cultivar paciência, e principalmente pela inspiração e força que me transmitem.

Aos meus padrinhos, Manuel e Clara, por me apoiarem desde sempre e estarem presentes ao longo de todas as etapas importantes da minha vida.

Ao Rui, por representar a força impulsionadora de todo o meu sucesso, e por ser o meu companheiro de todas as horas.

A todos os meus amigos, porque tenho seguramente os melhores do mundo. À Dani por estar sempre presente e ser como uma segunda mãe durante o meu percurso académico. Ao Mica por me fazer rir nas alturas em que mais preciso. À Ana por ter sido uma agradável surpresa na minha vida. À Bia por ser uma confidente e me entender melhor do que ninguém. À Vânia por ser a minha companheira de sempre. À Dédé por todos os bons momentos.

A todos os meus colegas de laboratório Beta, Ana, Rita, Deolinda Joana e um agradecimento especial ao Nuno e à Tânia pela disponibilidade demonstrada desde o início do meu trabalho e principalmente por toda a paciência que tiveram comigo

À Liliana por ter sido a melhor parceira de trabalho que alguém pode desejar.

Àqueles que continuamente acreditaram em mim, e àqueles que sempre duvidaram.



**palavras-chave:**

Terapia fotodinâmica, *Escherichia coli*, lipídios, hidroperóxidos, fotossensibilizadores, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina

**resumo**

A inativação fotodinâmica (PDI) é um método simples e eficaz para destruir microrganismos. Esta tecnologia baseia-se na administração de um fotossensibilizador (FS), normalmente uma porfirina ou derivados de ftalocianina, que é preferencialmente acumulado nas células microbianas. A posterior irradiação com luz visível, na presença de oxigénio, conduz à formação de espécies citotóxicas, particularmente espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como radicais livres e oxigénio singuleto, que causam danos celulares específicos e levam à inativação do microrganismo. Os principais alvos de PDI são as estruturas microbianas externas, como as paredes e membranas celulares. O conhecimento de como estes alvos moleculares são afetados assume uma grande importância para melhor compreender o processo de fotoinativação. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito causado por cinco derivados porfirínicos com diferente distribuição de carga durante o processo de fotoinativação em lipídios membranares de *Escherichia coli*. O efeito foi avaliado por quantificação de hidroperóxidos lipídicos e por análise da variação do perfil de ácidos gordos. Culturas de *E. coli* foram irradiadas com luz branca na presença de cada um dos fotossensibilizadores (5.0 µM) durante 90 e 270 minutos. Após o ensaio de fotoinativação os lipídios membranares foram extraídos e quantificados através do ensaio de fósforo. Os hidroperóxidos presentes nos extratos lipídicos totais foram quantificados através de FOX2 (*ferrous oxidation-xylenol orange*) e o perfil de ácidos gordos foi adquirido por cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID). Após PDI, foi observado a formação de hidroperóxidos com qualquer um dos fotossensibilizadores. A análise do perfil de ácidos gordos mostrou uma diminuição dos ácidos gordos insaturados que dependeu diretamente da distribuição de carga na porfirina. O fotossensibilizador que induziu a maior diminuição de ácidos gordos insaturados foi o que apresentou uma maior taxa de inativação. Uma vez provado que os lipídios da membrana bacteriana são afetados durante PDI, foi também avaliado o efeito dos mesmos fotossensibilizadores em sistemas modelo utilizando lipossomas de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina. A oxidação lipídica foi avaliada por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS). Foram adquiridos espectros de MS para todos os sensibilizadores em diversos tempos e concentrações para avaliar o efeito destas duas variáveis no processo de fotoinativação. Concluiu-se que os fosfolípidos das membranas bacterianas são importantes alvos moleculares de fotoinativação sendo a formação de hidroperóxidos um bom indicador deste processo.

**keywords**

Photodynamic therapy, *Escherichia coli*, lipids, hydroperoxides  
photosensitizers, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-  
phosphoethanolamine

**abstract**

Photodynamic inactivation (PDI) is a simple and controllable method to destroy microorganisms based on the production of reactive oxygen species (ROS) (e.g. free radicals and singlet oxygen), which irreversibly oxidize microorganism's vital constituents resulting in lethal damage. This technology requires the combined action of oxygen, light and a sensitizer (FS), which absorbs and uses the energy from light to produce those ROS. The main targets of the antibacterial photodynamic activity are the external microbial structures, as cell walls and cell membranes. For a better understanding of photoinactivation process, the knowledge of how some molecular targets are affected by PDI assumes a great importance. The aim of this work was to study the effect caused by positive charged porphyrin derivatives, used as FS, during photoinactivation process on *Escherichia coli* lipids. In this context, the effect of five porphyrin derivatives, bearing one to four positive charge was evaluated by the quantification of lipid hydroperoxides and by analysis of the variation of fatty acyl profiling. *E. coli* suspensions were irradiated with white light in the presence of each FS (5.0  $\mu$ M) and non-photosensitized bacteria were used as dark (with FS and without light) and light (irradiated without FS) controls. After PDI, the total lipids were extracted and quantified by phosphorus assay. Lipid oxidation was quantified by ferrous oxidation in xylenol orange (FOX2) assay and the fatty acyl profiling analysis was done by gas chromatography (GC). After PDI, it was observed an overall increase in the lipid hydroperoxides contents depending to the FS charge and its distribution on the macrocycle. The pattern of lipid oxidation had a high correlation with photoinactivation effectiveness of the five cationic porphyrins. In fact the FS that induced higher lipid oxidation was the one that corresponded to higher bacterial inactivation. Analysis of fatty acyl profile by GC showed a decrease in the unsaturated fatty acids, corroborate the relationship between lipid oxidation and photoinactivation. It was also evaluated the same sensitizers effects on the standard 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine. The oxidation of lipid was assessed by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS). MS spectra were acquired for all photosensitizers in separated systems at different times and concentrations to evaluate the effect of these two variables in efficiency of the photoinactivation. It can be concluded that bacterial membrane phospholipids are important molecular targets of photoinactivation being the formation of hydroperoxy derivatives a good indicator of the process.

# Índice

|                       |   |
|-----------------------|---|
| LISTA DE FIGURAS..... | I |
|-----------------------|---|

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| LISTA DE TABELAS..... | III |
|-----------------------|-----|

|                    |    |
|--------------------|----|
| ABREVIATURAS ..... | IV |
|--------------------|----|

|                     |   |
|---------------------|---|
| I. INTRODUÇÃO ..... | 1 |
|---------------------|---|

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1. TERAPIA FOTODINÂMICA ..... | 3 |
|-------------------------------|---|

|  |   |
|--|---|
| 1.1 Inativação fotodinâmica de microrganismos..... | 6 |
|--|---|

|   |   |
|---|---|
| 1.2 Porphirinas como Fotossensibilizadores..... | 8 |
|---|---|

|   |    |
|---|----|
| 1.3. Mecanismos de inativação fotodinâmica e alvos moleculares da terapia<br>fotodinâmica. .... | 10 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| 2. LÍPIDOS MEMBRANARES EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> ..... | 14 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| 2.1 Organização molecular de fosfolípidos e classes predominantes em <i>Escherichia coli</i> ..... | 15 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| 2.2 Biossíntese de fosfolípidos em <i>Escherichia coli</i> ..... | 17 |
|--|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA..... | 19 |
|------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| 4. PROCESSO DE FOTOINATIVAÇÃO BACTERIANA ..... | 20 |
|--|----|

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 5. OBJETIVO DO TRABALHO ..... | 22 |
|-------------------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| II. MATERIAL E MÉTODOS ..... | 23 |
|------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| 1. ENSAIO DE FOTOINATIVAÇÃO BACTERIANA ..... | 25 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| 1.1 Estirpe bacteriana e condições de crescimento. .... | 25 |
|---|----|

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 1.2 Fotossensibilizadores ..... | 25 |
|---------------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 1.3 Irradiação das culturas ..... | 27 |
|-----------------------------------|----|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 2. EXTRAÇÃO LIPÍDICA ..... | 28 |
|----------------------------|----|

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 3. QUANTIFICAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS..... | 28 |
|---------------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| 4. QUANTIFICAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS ..... | 29 |
|--|----|



|   |    |
|---|----|
| 5. ANÁLISE DE ÁCIDOS GORDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETETOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (GC-FID) .....                 | 30 |
| 6. ESTUDO DO EFEITO FOTODINÂMICO EM 1-PALMITOIL-2-OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOETANOLAMINA (POPE) .....                   | 31 |
| 6.1 Irradiação de POPE .....  | 31 |
| 6.2 Extração lipídica .....   | 31 |
| 6.3 Análise por espectrometria de massa (MS) .....  | 31 |
| 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 32 |
| III. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 33 |
| 1. ESTUDO DA FOTO-OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> . .....  | 35 |
| 1.1 Quantificação de hidroperóxidos .....   | 36 |
| 1.2 Avaliação da variação do perfil de ácidos gordos em extratos lipídicos de <i>E. coli</i> após foto-oxidação ..... | 39 |
| 2. ESTUDO FOTODINÂMICO EM 1-PALMITOIL-2-OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOETANOLAMINA (POPE)                                   |    |
| 43  |    |
| IV. CONCLUSÃO .....   | 57 |
| V. BIBLIOGRAFIA .....   | 61 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Representação de fotossensibilizadores de segunda geração. (A) BPD-MA; (B) m-THPC e (C) Ftalocianina .....  | 5  |
| Figura 2 - Representação do macrociclo tetrapirrólico de uma porfirina com indicação das posições $\beta$ -pirrólicas e meso. ....   | 8  |
| Figura 3 - Estrutura do grupo heme (a) e das clorofilas a e b (b).....   | 9  |
| Figura 4 - Formação de hidroperóxidos lipídicos por mecanismo do Tipo I. ....  | 12 |
| Figura 5 - Representação esquemática de um glicerofosfolípido. ....  | 16 |
| Figura 6 - Via de síntese de fosfolípidos em <i>Escherichia coli</i> . As enzimas numeradas realizam: 1) Síntase de CDP-diacilglicerol (CdsA); 2) Síntase de Fosfatidilserina (PssA); 3) Descarboxilase de Fosfatidilserina (Psd); 4) Síntase de Fosfatidilglicerofosfato (PgsA); 5) Fosfatase de Fosfatidilglicerofosfato (Pgp) codificada por três genes; 6) Síntase de Cardiolipina (Cls) codificada por três genes com um substrato PG nos três casos e um segundo substrato para {ClsA} e [ClsC] indicado pelos parênteses. Não foi definido o segundo substrato para ClsB; 7) Fosfatidilglicerol: Oligossacarídeo (MDO) derivado da pré-membrana sn-glicerol-1-P transferase (síntase de MDO); 8) Qínase de diacilglicerol (DgkA)..... | 18 |
| Figura 7 - Representação esquemática de PDI em Gram-positivas e Gram-negativas. O fotossensibilizador na presença de luz produz espécies de oxigénio tóxicas. Fotossensibilizadores aniónicos (ou neutros) são normalmente activados apenas contra bactérias Gram-positivas uma vez que não podem atravessar a membrana das Gram negativas que está carregada negativamente. Fotossensibilizadores catiónicos podem inactivar bactérias Gram positivas e Gram-negativas. Uma vez ativado pela luz o fotossensibilizador gera espécies de oxigénio ativas que podem modificar muitas moléculas biológicas e conduzir à morte celular.....   | 21 |
| Figura 8 - Representação da estrutura das porfirinas utilizada como fotossensibilizador na inativação de <i>Escherichia coli</i> . (A) Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF, (B) Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-PF <sub>adj</sub> , (C) Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-PF <sub>opp</sub> , (D) Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF, (E) Tetra-Py <sup>+</sup> -Me.....   | 26 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 9 – Espectros de absorção de Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF, Tetra-Py <sup>+</sup> -Me, Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF <sub>adj</sub> , Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF <sub>opp</sub> e Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF .....  | 27 |
| Figura 10 - Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de <i>Escherichia coli</i> após irradiação durante 90 e 270 minutos com as porfirinas Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF, Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF adj., Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF opp., Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF e Tetra-Py <sup>+</sup> -Me utilizando o método de FOX 2, onde (A) representa o controlo claro e as porfirinas testadas e (B) representa o controlo escuro e as porfirinas testadas. Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão, e diferença significativa *** (p<0.001), ** (p<0.01) e * (p<0,05) entre controlo claro e amostras (A) e controlo escuro e amostras (B). .....                                 | 37 |
| Figura 11 - Percentagem relativa de ácidos gordos encontrados em <i>E. coli</i> após irradiação durante 90 e 270 minutos com Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF, Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF <sub>adj</sub> , Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF <sub>opp</sub> , Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF, Tetra-Py <sup>+</sup> -Me.....  | 39 |
| Figura 12 – Quantificação do perfil de ácidos gordos. Controlo; (A <sub>1</sub> ) Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF – 90 Minutos; (A <sub>2</sub> ) Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF – 270 Minutos; (B <sub>1</sub> ) Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF-adj – 90 Minutos; (B <sub>2</sub> ) Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF-adj – 270 Minutos; (E <sub>1</sub> ) Tetra-Py <sup>+</sup> -Me – 90 Minutos; (E <sub>2</sub> ) Tetra-Py <sup>+</sup> -Me – 270 Minutos; (C <sub>1</sub> ) Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF-Opp – 90 Minutos; (C <sub>2</sub> ) Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF-opp – 270 Minutos; (D <sub>1</sub> ) Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF – 90 Minutos; (D <sub>2</sub> ) Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF – 270 Minutos.. | 41 |
| Figura 13 - Estrutura química da POPE.....  | 43 |
| Figura 14 - Espectro ESI-MS da POPE não modificada (A) e irradiada durante 270 minutos a uma concentração de 5 uM na presença de Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF (B) e Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF (C) .....   | 44 |
| Figura 15 – Espectros ESI-MS/MS do ião [M-H] <sup>-</sup> a m/z 716.5 (A) e a m/z 748.7 (B).....  | 46 |
| Figura 16 – Percentagem de variação entre a relação de iões a m/z 748/716.....  | 47 |
| Figura 17 - Espectros ESI-MS de POPE + Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF. [2,5 µM] - 90 Minutos (A1); [2,5 µM] - 270 Minutos (A2); [5µM] - 90 Minutos (B1); [5 µM] - 270 Minutos; [10 µM] - 90 Minutos (C1); [10 µM] - 270 Minutos (C2).....   | 49 |
| Figura 18 - Espectros ESI-MS de POPE + Mono-Py <sup>+</sup> -Me-PF. [2,5 µM] - 90 Minutos (A1); [2,5 µM] - 270 Minutos (A2); [5µM] - 90 Minutos (B1); [5 µM] - 270 Minutos; [10 µM] - 90 Minutos (C1); [10 µM] - 270 Minutos (C2).....  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 19 – Relação entre $[M-H]^-$ e os produtos de oxidação formados após irradiação com diferentes fotossensibilizadores durante 90 e 270 minutos a uma concentração igual a 5 $\mu M$ . ..... | 51 |
| Figura 20 - Abundância relativa dos iões $[M-H]^-$ (716) e $[M-H+ 2O]^-$ (748) observados nos espectros ESI-MS na presença de 2,5 $\mu M$ de porfirina. ....                                      | 53 |
| Figura 21 - Abundância relativa dos iões $[M-H]^-$ (716) e $[M-H+ 2O]^-$ (748) observados nos espectros de ESI-MS na presença de 5 $\mu M$ de porfirina. ....                                     | 54 |
| Figura 22 – Abundância relativa dos iões $[M-H]^-$ (716) e $[M-H+ 2O]^-$ (748) observados nos espectros ESI-MS na presença de 10 $\mu M$ de porfirina. ....                                       | 55 |

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Teste estatístico Bonferroni para comparação de pares de fotossensibilizadores com diferença significativa *** ( $p < 0.001$ ), ** ( $p < 0.01$ ) e n.s. ( $p > 0.05$ ) entre eles, para o tempo 90 e 270 minutos. .... | 48 |
|--|----|

## Abreviaturas

|   |   |
|---|---|
| $^1\text{O}_2$                            | Oxigénio singuleto  |
| $^3\text{FS}$                             | Fotossensibilizador no estado tripleto excitado                                   |
| $^3\text{O}_2$                            | Oxigénio molecular no estado fundamental  |
| ALA                                       | Ácido delta-aminolivulínico   |
| BHT                                       | 2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenolhidroxitolueno butilado                    |
| BpD – MA                                  | Derivados de benzoporfirina   |
| CFU                                       | Unidades formadoras de colónias   |
| CL  | Cardiolipina  |
| CoA                                       | Coenzima A  |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF <sub>adj.</sub> | Di-iodeto de 5,10-bis(1-metilpiridínio-4-il)-15,20-bis(pentafluorofenil)porfirina |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-PF <sub>opp.</sub> | Di-iodeto de 5,15-bis(1-metilpiridínio-4-il)-10,20-bis(pentafluorofenil)porfirina |
| DMSO                                      | Dimetilsulfóxido  |
| EDTA                                      | Ácido etilenodiamino  |
| ESI                                       | Ionização por electrospray  |
| F <sup>•</sup>                            | Anião radical do fotossensibilizador  |
| FDA                                       | <i>Food and drugs administration</i>  |
| FID                                       | Detetor de ionização de chama   |
| FOX                                       | Ferrous oxidation – xylenol orange  |
| FS  | Fotossensibilizador   |
| GC  | Cromatografia gasosa  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>             | Peróxido de hidrogénio  |
| HO <sup>•</sup>                           | Radical hidroxilo   |
| HPT                                       | Derivados de hematoporfirina  |
| L <sup>•</sup>                            | Radical lipídico  |
| LH  | Lípido insaturado   |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>LOO<sup>•</sup></b>            | Radical peroxil lipídico   |
| <b>LOOH</b>                       | Hidroperóxido lipídico   |
| <b>LPS</b>                        | Lipopolissacarídeos  |
| <b>Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF</b>  | Tri-iodeto de 5-(1-metilpiridínio-4-il)-10,15,20-tris(pentafluorofenil)porfirina |
| <b>MS</b>                         | Espectrometria de massa  |
| <b>m-THPC</b>                     | Derivados de meso-tetrahidroxifenilclorina                                       |
| <b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> | Radical superóxido   |
| <b>PA</b>                         | Ácido fosfatídico  |
| <b>PBS</b>                        | Tampão fosfato salino  |
| <b>PDI</b>                        | Inativação Fotodinâmica  |
| <b>PDT</b>                        | Terapia Fotodinâmica   |
| <b>PE</b>                         | Fosfatidiletanolamina  |
| <b>PG</b>                         | Fosfatidilglicerol   |
| <b>POPE</b>                       | 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina                               |
| <b>PpIX</b>                       | Protoporfina IX  |
| <b>PS</b>                         | Fosfatidilserina   |
| <b>R<sup>•</sup></b>              | Radical do substrato   |
| <b>RH</b>                         | Agente redutor   |
| <b>ROO<sup>•</sup></b>            | Espécies hidroxilo radicalares   |
| <b>ROS</b>                        | Espécies reativas de oxigênio  |
| <b>Tetra-Py<sup>+</sup>-Me</b>    | Tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina             |
| <b>Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF</b>   | Tri-iodeto de 5,10,15-(1-metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina     |
| <b>TSA</b>                        | Agar de soja tríptico  |
| <b>TSB</b>                        | Caldo de soja tríptico   |

# **I. Introdução**





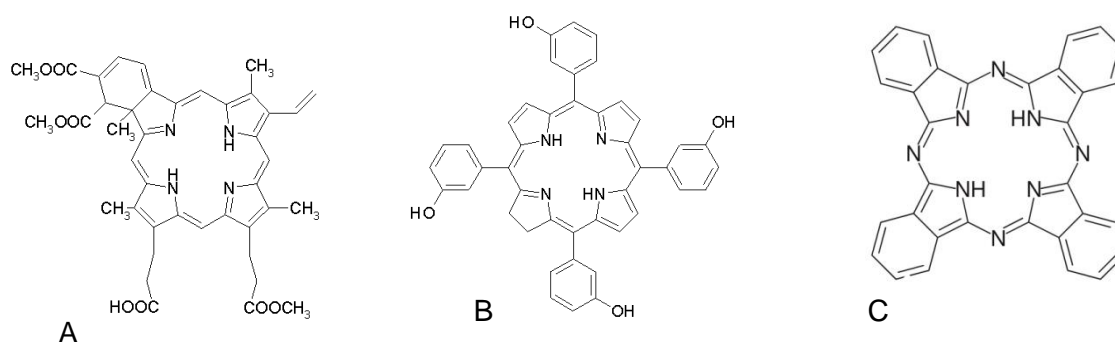
## 1. Terapia Fotodinâmica

Desde o início dos tempos que a luz tem sido responsável pelo desenvolvimento da vida na terra. Ao longo dos tempos a luz tem sido utilizada como meio de tratamento de uma variedade de doenças. As antigas culturas egípcias usavam o efeito terapêutico do sol no tratamento de vitiligo, da psoríase e do cancro (Ackroyd & Mitton, 2008). Da mesma forma, também os antigos terapeutas da Índia, Grécia e Roma, utilizavam o conceito de helioterapia (banhos de sol) por considerar a energia solar como um agente antisséptico benéfico no tratamento de doenças e renovação da saúde. Literatura médica indiana que data o ano 1500 A.C descreve o tratamento de áreas da pele não pigmentadas através da combinação de uma mistura de ervas com luz solar. Também literatura budista com cerca de 200 anos D.C, bem como documentos chineses que remetem ao século X, fazem referências semelhantes (Huang, 2006). Já no século XX, o estudante de medicina Oscar Raab, relatou o conceito de morte celular induzida, através da interação da luz com determinados compostos químicos. No decorrer dos seus trabalhos descreveu o efeito letal da luz em culturas bacterianas, na presença de acridina (Raab, 1900). Também o médico dinamarquês Niels Finsen, foi galardoado em 1903 com o prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina pelo seu trabalho com fototerapia. Finsen tratou com sucesso varíola e tuberculose cutânea, com luz vermelha e ultravioleta, respectivamente. (Finsen, 1901). Von Tappeiner e a sua equipa, da clínica dermatológica de Munique, relataram pela primeira vez o tratamento de tumores de pele através da interação de luz branca com eosina aplicada topicamente, e identificaram o oxigénio como o principal componente em reações de fotossensibilização. A expressão “ação fotodinâmica” foi aplicada pela primeira vez em 1907 (von Tappeiner & Jesionek, 1903). Contudo, foi apenas em 1960 que se iniciou a era atual da terapia fotodinâmica, com os trabalhos de Lipson e Baldes. (Lipson & Baldes, 1961). Estes verificaram que os tecidos neoplásicos em pacientes após cirurgia apresentavam fluorescência quando expostos a radiação ultravioleta, após a administração de uma mistura de compostos derivados de hematoporfirina (HPT). Outros investigadores testaram as propriedades de HPT na erradicação de tumores localizados, mas a extinção dos tumores utilizando a terapia

fotodinâmica só foi completamente conquistada no início de 1970. (Dougherty et al., 1975; Dougherty et al., 1978) Foi nesta altura que Dougherty e outros autores estabeleceram um procedimento para a preparação de HPT para utilização em terapia fotodinâmica que seguia diretrizes estabelecidas pela FDA (*Food and Drugs Administration*) que, aliado ao desenvolvimento de fontes de luz apropriadas, permitiu uma maior eficácia nos tratamentos procedentes (Dougherty et al., 1975).

A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy* - PDT) tem sido atualmente, utilizada com sucesso no tratamento de certos tumores localizados, tais como cancro de pele e bexiga (Almeida et al., 2009; Tyrrell et al., 2011). Envolve a administração de um fotossensibilizador (FS), que é seletivamente incorporado pelas células, e posterior irradiação num comprimento de onda adequado (normalmente luz visível ou laser direcionados através de fibra ótica). A combinação destes dois elementos não tóxicos, fotossensibilizador e luz, na presença de oxigénio molecular no meio envolvente conduz à formação de espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species* - ROS) e resulta na destruição de tecidos ou células devido ao efeito citotóxico localizado (Dougherty et al., 1998; Demidova & Hamblin, 2005)

Embora existam excelentes fotossensibilizadores (FS), apenas alguns estão comercialmente disponíveis. O primeiro FS aprovado e utilizado clinicamente para PDT foi uma mistura solúvel em água de porfirinas designadas por derivados de HPT e, mais tarde, uma versão purificada destes compostos, designada por porfímero de sódio (Photofrin®). Embora o Photofrin® seja ainda comumente utilizado em PDT, a sua fototoxicidade prolongada (6 a 10 semanas) e baixa absorvância relativa (630 nm) constituem grandes desvantagens aquando o uso deste FS. Tendo em conta as limitações da primeira geração de FS, vários esforços foram desenvolvidos no sentido de sintetizar uma segunda geração de fotossensibilizadores. Os novos FS incluem derivados de benzoporfirinas (BpD-MA), derivados de meso-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC) e ftalocianinas (Figura 1) (Josefsen & Boyle, 2008).



**Figura 1** - Representação de fotossensibilizadores de segunda geração. (A) BPD-MA; (B) m-THPC e (C) Ftalocianina.

Os FS pertencentes à segunda geração de fotossensibilizadores têm a vantagem de não causar fotossensibilidade prolongada e atuar em comprimentos de onda mais altos (660-690 nm) permitindo uma maior penetração nos tecidos ( Josefsen & Boyle, 2008; Zhao & Yu-Ying He, 2010). Em meados de 1990, surgiu uma nova abordagem de PDT usando o ácido delta-aminolevulínico (ALA) ( Kennedy et al., 1990; Allison et al., 2004). O ALA é um composto que ocorre naturalmente, e é o principal intermediário na biossíntese do grupo heme. Este composto ou um dos seus ésteres, como o metil-ALA, é administrado como pró-droga por via tópica ou por via oral. É normalmente formado nas mitocôndrias a partir de succinil-CoA e glicina. A conjugação de oito moléculas de ALA produz a protoporfirina IX (PpIX) que finalmente conduz à formação do grupo heme. A conversão de PpIX em substratos posteriores requer a atividade de uma enzima do tipo ferroquelatase mitocondrial. Quando o ALA é administrado externamente, o PpX não pode ser rapidamente convertido no seu produto final (heme) por ferroquelatases e por conseguinte acumula-se no interior das células (Wachowska et al., 2011). No caso específico de tratamento de tumores, tanto a absorção de ALA como a conversão para PpIX, ocorre em taxas elevadas no tecido neoplástico, comparativamente aos tecidos circundantes normais (De Rosa & Bentley, 2000), o que permite uma diferença significativa de concentrações entre os tecidos do tumor e os tecidos normais (Loh et al., 1993).

Embora inicialmente a PDT tenha sido utilizada essencialmente em tratamento de tumores, nos últimos anos alargou-se a investigação para sua utilização em doenças não cancerígenas e verificou-se o seu sucesso, principalmente no tratamento de degeneração macular associada à idade (Hader & Jori, 2003). Mais recentemente, verificou-se que esta terapia também pode ser aplicada na inativação de microrganismos (Carvalho et al., 2007).

### **1.1 Inativação fotodinâmica de microrganismos**

De acordo com um estudo de 2008, só na união europeia, por ano, morrem pelo menos 25000 pessoas devido a infeções causadas por bactérias multirresistentes. Estima-se que os custos em cuidados de saúde adicionais a estas doenças e a perda de produtividade resultante rondam 1,5 mil milhões de euros (*Bulletin of the World Health Organization*, 2011). Embora não existam dados globais sobre a totalidade de casos fatais devido a infeções bacterianas por estirpes resistentes, este é, sem dúvida, um problema de saúde pública à escala mundial. A prescrição inadequada ou excessiva de antibióticos e a negligência no tratamento por parte dos pacientes, associado a fatores de natureza social como a adição generalizada de antibióticos à ração para animais, a frequente troca de microrganismos através de viagens, bem como a pobreza entre as populações de países em desenvolvimento, são as principais causas que conduzem os microrganismos a desenvolverem mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Estes mecanismos incluem o espessamento da parede exterior e codificação de novas proteínas que evitam a penetração dos fármacos. Podem também surgir mutantes deficientes em canais de porina, que permitem o influxo de produtos químicos adicionados externamente, nomeadamente antibióticos (Harder et al., 1981; Roland et al., 1994; Boyle-Vavra et al., 2001). Este comportamento levou a uma mudança no padrão de doenças infecciosas e ao aparecimento de estirpes bacterianas patogénicas resistentes a antibióticos. Deste modo, o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas representa uma necessidade emergente.

A inativação fotodinâmica (*Photodynamic Inactivation* – PDI) apresenta-se como uma alternativa promissora no controlo de microrganismos (Caminos & Durantini, 2006; Tavares et al., 2010; Costa et al., 2012). Esta técnica tem-se mostrado eficaz *in vitro* na inativação de bactérias (incluindo estirpes resistentes a fármacos), leveduras, vírus e protozoários (Wainwright, 1998; Makowski & Wardas, 2001). O princípio de ação não difere da terapia fotodinâmica convencional, e baseia-se na administração de um FS, normalmente uma porfirina ou derivados de ftalocianina, que é preferencialmente acumulado nas células microbianas. A posterior irradiação com luz visível, na presença de oxigénio, conduz à formação de espécies citotóxicas, particularmente espécies reativas de oxigénio (ROS), que causam danos celulares específicos e levam à inativação do microrganismo (Ochsner, 1997; Derosa & Crutchley, 2002).

A inativação fotodinâmica de microrganismos tem sido estudada não só como aplicação clínica, mas também ambiental, para desinfecção de água potável e como tratamento terciário em estações de tratamento de águas residuais (Jemli et al., 2002; Rojas-Valencia et al., 2004). Bonnett e outros autores (2006) utilizaram uma porfirina e uma ftalocianina suportadas sobre uma membrana polimérica de quitosano num modelo reator de desinfecção de água (Bonnett et al., 2006). O estudo sugere a possibilidade da aplicação do processo fotodinâmico num sistema de tratamento de água à escala real, uma vez que a recuperação e reutilização dos fotossensibilizadores utilizados, além de tornar a tecnologia mais económica evitam a contaminação do ambiente (Bonnett et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Carvalho et al., 2010)

Os métodos atuais de desinfecção de águas baseiam-se na aplicação de cloro, dióxido de cloro, ozono ou radiação ultra violeta e, apesar de serem eficazes, levam à formação de subprodutos tóxicos, assim como a um acréscimo de preço (Richardson et al., 2000). Assim, a inativação fotodinâmica de microrganismos surge como uma alternativa válida, tendo em conta a sua eficácia e baixo custo para substituir ou complementar os métodos de desinfecção tradicionais.

## 1.2 Porfirinas como Fotossensibilizadores

A eficácia de PDI depende bastante do fotossensibilizador utilizado. Um fotossensibilizador é definido como um composto químico, que após a absorção de luz induz uma alteração química ou física de outro composto químico. Em PDI, os sensibilizadores utilizados são altamente seletivos na inativação bacteriana. O uso de FS a concentrações na gama do nanomolar permite inativar eficientemente os microrganismos sem danificar as células de mamíferos que são afetadas quando a concentração de FS é na gama do micromolar (Almeida et al., 2011). Por outro lado, devido ao mecanismo de ação de PDI e ao facto de ser um processo multi-alvo não há desenvolvimento de mecanismos de resistência (Merchat et al., 1996; Winckler, 2007).

Entre os fotossensibilizadores mais utilizados em PDI, encontram-se os compostos porfirínicos. As porfirinas são uma classe de compostos heterocíclicos aromáticos, com propriedades físicas e químicas únicas, que estão amplamente dispersas na natureza e participam em processos bioquímicos vitais. A sua estrutura é a de um macrociclo tetrapirrólico formado por quatro anéis pirrólicos ligados entre si através de quatro pontes metínicas (Figura 2). Os quatro átomos de carbono que formam as pontes metínicas são designados de posições *meso*, e as posições dos anéis pirrólicos são designadas por posições *β-pirrólicas*. Estes são importantes em funções biológicas essenciais como a respiração, fotossíntese e transporte de eletrões. Os compostos porfirínicos fazem parte de moléculas como a hemoglobina, mioglobina, peroxidases, catalases, citocromos, clorofilas, vitamina B12 e outros (Stadtländer, 2013).

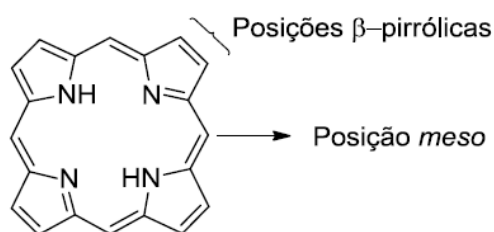


Figura 2 - Representação do macrociclo tetrapirrólico de uma porfirina com indicação das posições *β-pirrólicas* e *meso* ( Josefsen & Boyle, 2012).

Os grupos porfirínicos de proteínas como a hemoglobina, mioglobina e citocromo, podem existir na forma de um complexo de ferro, designado por grupo heme (Figura 3) (complexo de ferro da protoporfirina IX descoberto por Fisher em 1929). É esta estrutura tetrapirrólica que torna possível o transporte de oxigênio na corrente sanguínea. Em proteínas como o citocromo este grupo heme participa na transferência de eletrões e produção de energia celular (Manso, 1977).

As clorofilas presentes nos cloroplastos de plantas verdes, desempenham um papel muito importante na fotossíntese. Utilizam a energia da luz para a conversão de dióxido de carbono e água em hidratos de carbono e oxigênio, e têm um grupo prostético que corresponde a um complexo metálico de magnésio, de estrutura porfirínica (Figura 3) (Wöhrle, 1997).

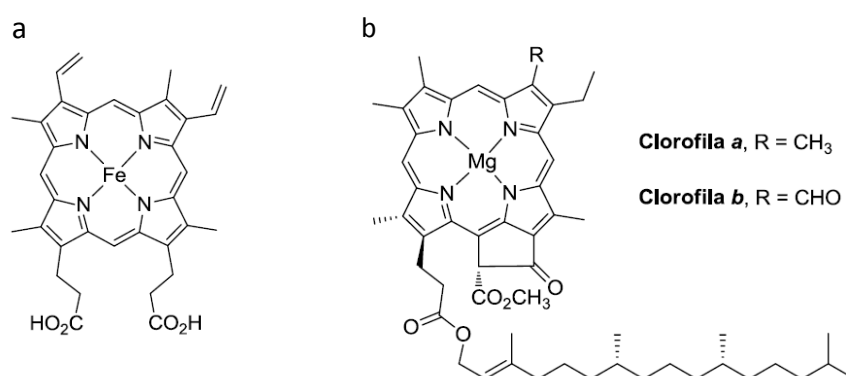


Figura 3 - Estrutura do grupo heme (a) e das clorofilas *a* e *b* (Adaptado de Beale, 2009).

Devido às suas propriedades, as porfirinas são utilizadas numa infinidade de aplicações que vão desde a fotossíntese artificial, catálise de oxidação, sensores, ótica não linear e nanomateriais para a terapia fotodinâmica do cancro (PDT) e até, mais recentemente, na fotoinativação de microrganismos (Kadish et al., 2003). Estes compostos são altamente corados e apresentam bandas típicas de absorção na zona do visível do espectro eletromagnético. Para porfirinas não complexadas o seu espectro de absorção apresenta uma forte banda característica na região dos 400 nm, denominada por banda Soret, e quatro bandas de absorção menos intensas, designadas por bandas Q, compreendidas entre 450 nm e 600 nm no espectro. A banda Soret é a banda de maior

intensidade nos espectros de visível de compostos do tipo porfirina, clorina, bacterioclorina, isobacterioclorina, e reflete a presença de elétrons responsáveis pelo caráter aromático (Sheers & Kats, 1975).

### **1.3. Mecanismos de inativação fotodinâmica e alvos moleculares da terapia fotodinâmica.**

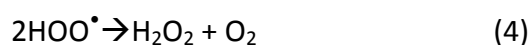
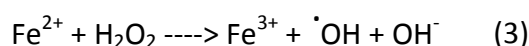
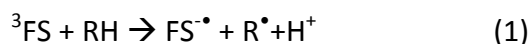
Associado ao mecanismo de fotossensibilização está a transmissão de luz, num comprimento de onda adequado, à molécula fotossensibilizadora. Esta possui um macrociclo porfirínico que absorve a energia da radiação visível e transita do seu estado fundamental para o estado excitado. Neste último estado, o fotossensibilizador pode seguir algumas vias de decaimento, nomeadamente a passagem para um estado excitado tripleto (por inversão de spin) (Wainwright, 1998). A interação do fotossensibilizador no estado tripleto com o oxigénio endógeno das células alvo, bem como com o oxigénio presente no meio envolvente, provoca um efeito citotóxico que pode ocorrer por dois processos denominados: Tipo I e Tipo II. (Castano et al., 2004)

No processo de fotossensibilização por mecanismo do Tipo I (Figura 6) ocorre a transferência de elétrons do agente redutor (RH) para o fotossensibilizador no estado tripleto excitado ( $^3FS$ ) e resulta na formação de dois radicais livres  $F^\bullet$  (ânion radical do fotossensibilizador) e  $R^\bullet$  (radical do substrato) e um próton doado pelo fotossensibilizador (equação 1). Ambos os radicais podem induzir a formação de um radical lipídico ( $L^\bullet$ ) num processo designado por cascata de peroxidação. A espécie radical proveniente do substrato ( $R^\bullet$ ) pode reagir com o oxigénio ( $O_2$ ) e formar espécies hidroperoxilo radicalares ( $ROO^\bullet$ ) e outros radicais citotóxicos (equação 2-4). Fazem parte destas espécies citotóxicas radicais hidroxilo, radicais superóxido e peróxido de hidrogénio assim como derivados de lípidos radicalares (Girotti, 2001).

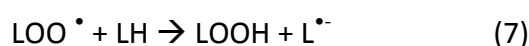
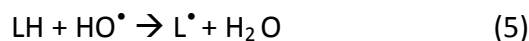
O ânion radical proveniente do fotossensibilizador ( $FS^\bullet$ ) pode iniciar a redução de um elétron sequencial de  $O_2$  para  $H_2O_2$  (Foote, 1968; Girotti, 1990). O  $H_2O_2$  é reduzido na presença de  $Fe^{2+}$  por reações do tipo Fenton (descrita em 1894) e dá origem ao  $HO^\bullet$  (Equação 3). O radical hidroxilo é altamente reativo, e consequentemente com tempo de vida curto e pode reagir rapidamente com biomoléculas, abstraindo um próton e



formando um novo radical  $R^\bullet$ . A decomposição do peróxido de hidrogénio é considerada a reação mais prevalente em sistemas biológicos e a fonte de vários produtos nocivos de peroxidação lipídica.



Além de radicais hidroxilo, também são produzidos por mecanismo do Tipo I, radicais superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). Estes, embora possam ser diretamente tóxicos, não são particularmente reativos em sistemas biológicos, mas quando protonados ( $HOO^\bullet$ ) podem conduzir à produção de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e oxigénio (equação 4) (Costa et al., 2012) culminando na produção secundária de espécies mais reativas, tais como  $^\bullet OH$  (Polle, Krings, & Rennenberg, 1989).



Uma vez formado, o  $OH^\bullet$  desencadeia uma série de reações em cadeia, características da peroxidação lipídica. Esta cascata de reações é iniciada por abstração de um hidrogénio alílico de um lípido insaturado proximal LH (Equação 5). Nos fosfolípidos, o hidrogénio abstraído é tipicamente dos ácidos gordos na posição *sn*-2. Desta reação gera-se um lípido radical ( $L^\bullet$ ) que reage com  $^3O_2$  numa taxa de difusão limitada para originar um radical peroxil lipídico –  $LOO^\bullet$  (Equação 6). O peroxilo lipídico ( $LOO^\bullet$ ) formado é reduzido a hidroperóxido lipídico –  $LOOH$  (Equação 7) (Figura 4) (Girotti, 1990; Kappus, 1985).

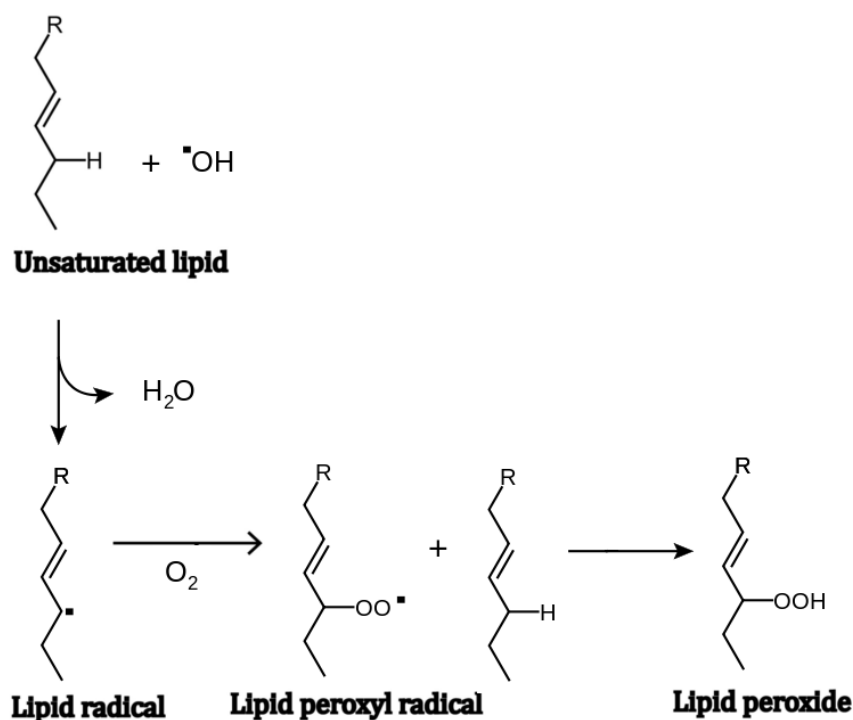
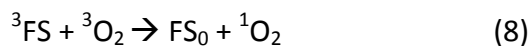


Figura 4 - Formação de hidroperóxidos lipídicos por mecanismo do Tipo I.

A peroxidação lipídica por mecanismos do Tipo I é muito semelhante à auto-oxidação comum nos lípidos. (Kappus, 1985). O mecanismo mostrado nas equações anteriores pode ser previsto para diferentes condições de pares fotossensibilizador-agente redutor (FS/RH). Cada uma das vias de reação pode dar origem a um número relativamente grande de produtos de oxidação primários e secundários, aumentando assim a complexidade do processo (Foote, 1968).

No processo oxidativo do Tipo II é gerado oxigénio singuleto, uma espécie altamente reativa com capacidade de oxidar uma série de biomoléculas. Um fotossensibilizador quando irradiado num comprimento de onda apropriado passa ao estado tripleto ( $^3\text{FS}$ ) e transfere energia para o oxigénio molecular no estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ). Esta transferência de energia promove a inversão do spin de um dos eletrões da molécula de oxigénio tripleto transformando-o em oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ) (equação 8) (Derosa & Crutchley, 2002). Tem sido sugerido que o oxigénio singuleto possa também ser formado durante a degradação de peróxidos lipídicos e, por isso, causar a produção de outras moléculas com grupos hidroperóxido (Derosa & Crutchley, 2002).



O  $^1\text{O}_2$  pode reagir diretamente com os ácidos gordos insaturados dos fosfolípidos e originar hidroperóxidos (equação 9) com a posição dupla deslocada para a posição alílica. Na presença de iões metálicos, os LOOH formados, podem igualar uma reação do Tipo I e propagar-se numa nova cadeia de reação. Na ausência de ferro ou de outros iões metálicos, os LOOH irão acumular-se proporcionalmente à dose de luz recebida. É de realçar que durante as reações entre o  $^3\text{FS}$  com o  $^3\text{O}_2$  há uma probabilidade finita na transferência de eletrões que irá ocorrer, dando origem a  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como espécie reativa. No entanto, para a maioria dos sensibilizadores, esta reação é muito menos eficiente do que transferência de energia e formação de  $^1\text{O}_2$  (Foote, 1991).

Os produtos resultantes dos dois tipos de mecanismo podem causar danos nas biomoléculas. Apesar de se saber que a PDI pode afetar diferentes biomoléculas, o processo de inativação bacteriano não é ainda muito conhecido e não se sabe qual a extensão do dano bacteriano induzido pelo efeito fotodinâmico. Alguns estudos apontam para que as proteínas e o DNA sejam afetados em PDI. As proteínas presentes na membrana, quando alvos de oxidação fotodinâmica, mediada por oxigénio singuleto, conduzem à formação de peróxidos de proteínas e carbonilos, prejudiciais para a célula (Cabiscol et al., 2000). Estudos laboratoriais do efeito fotodinâmico em DNA, revelam que, embora alguns FS se possam ligar de forma complexa ao DNA, e tenha sido observada fotoclivagem em DNA genómico de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Salmon-Divon et al., 2004; Caminos et al., 2008; Spesia et al., 2009), RNA (Salmon-Divon et al., 2004; Alves et al., 2013a) e DNA plasmídico (Salmon-Divon et al., 2004; Spesia et al., 2009), este não é o principal alvo em PDI. A fotoclivagem de DNA bacteriano ocorre quando as células já sofreram um longo período de fotoinativação ou já não se encontram viáveis (Caminos et al., 2008; Alves et al., 2013a). Poucos estudos se dedicaram à forma como os lípidos membranares são alterados.

Kim e outros autores (2010) descreveram a morte celular induzida por terapia fotodinâmica utilizando a ftalocianina Pc4 como fotossensibilizador, onde identificaram os produtos de oxidação de cardiolipina. Os autores detetaram a formação de hidroperóxidos lipídicos e de proteínas oxidadas, na presença de Pc4, atribuindo a estes processos oxidativos o efeito nocivo acompanhado de morte celular (Kim, Rodriguez, Oleinick, & Anderson, 2010; Rodriguez et al., 2010). A primeira abordagem lipidômica de oxidação de fosfolípidos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com uma porfirina catiónica Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF mostrou, além de hidroperóxidos lipídicos, formação de novas espécies moleculares oxidadas e alterações nas quantidades relativas de diferentes classes de fosfolípidos. (Alves et al., 2013b; Alves, et al., 2013c)

## **2. Lípidos membranares em *Escherichia coli***

Segundo o modelo de mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson (1972), os lípidos membranares assumiam uma distribuição homogênea. No entanto, contrariando a homogeneidade da membrana, tornou-se evidente que as membranas celulares deveriam ser lateralmente polarizadas a fim de produzir ambientes específicos para determinadas proteínas membranares, em particular proteínas polares quimiorreceptoras, proteínas de polimerização de actina e proteínas envolvidas na divisão celular (Shapiro et al., 2002). Além disso, outros estudos sugerem a heterogeneidade lateral no domínio lipídico das membranas, tanto em eucariotas como procariotas (Dowhan et al., 2004; Vereb et al., 2003). Alguns trabalhos que utilizaram técnicas biofísicas, mostraram a distribuição desigual de corantes lipofílicos fluorescentes e a distribuição e coloração seletiva da região septal em micobactérias (Christensen et al., 1999). Por outro lado, a distribuição de fluorescência em células de *Escherichia coli* marcadas com um corante lipofílico foi nitidamente desigual (Fishov & Woldringh, 1999). Estes dados confirmam a heterogeneidade de fosfolípidos nas membranas bacterianas, caracterizada não só pela assimetria dos fosfolípidos ao longo da membrana, bem como perfis e constituições lipídicas distintas dependendo do tipo de bactéria (Layre & Moody,

2013) o que sugere a necessidade de futuros trabalhos neste domínio e na relevância dessa heterogeneidade em funções fisiológicas.

Geralmente, designa-se por lípido qualquer molécula insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos (tais como clorofórmio, éter, benzeno, acetona). Os lípidos biológicos abrangem um vasto grupo de moléculas que ocorrem naturalmente e incluem ácidos gordos, ceras, eicosanóides, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, fosfolípidos, esfingolípidos, esteróis, terpenos, prenol, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e outros (Vance & Vance, 2008). Em alternativa, também podem ser definidos como substâncias naturais, que na sua estrutura, apresentam uma cadeia de pelo menos 10 átomos de carbono (Motta, 2009).

Desempenham funções biológicas essenciais que incluem a participação na composição das membranas biológicas, precursores de compostos essenciais, agentes emulsionantes (agentes isolantes e vitaminas), armazenamento de energia e componentes de bio-sinalização intra e intercelular (Matsumoto et al., 2006)

## **2.1 Organização molecular de fosfolípidos e classes predominantes em *Escherichia coli***

Os fosfolípidos são os principais componentes lipídicos estruturais das membranas. Designam-se por fosfolípidos as moléculas que são ésteres de glicerol, de ácidos gordos e ácido fosfórico (Nelson & Cox, 2005). Estes são moléculas anfipáticas constituídas por caudas hidrofóbicas de cadeias de ácidos gordos saturados ou insaturados esterificados a dois grupos hidroxilo do glicerol, e uma cabeça polar hidrofílica que contém um grupo fosfato ao qual se ligam outros grupos carregados ou polares. A parte hidrofílica encontra-se esterificada no terceiro grupo hidroxilo do glicerol. As moléculas ligadas ao grupo fosfato definem a classe de fosfolípidos, e as mais comuns são o glicerol, a colina, o inositol, a serina ou a etanolamina. Assim, consoante os grupos ligados ao fosfato, os fosfolípidos poderão ter carga positiva, negativa ou serem eletricamente neutros (Barbosa, 1995a).

Os fosfolípidos dividem-se em dois subgrupos: glicerofosfolípidos e esfingomielinas. Os glicerofosfolípidos representam geralmente os principais componentes lipídicos das membranas celulares (Figura 5).

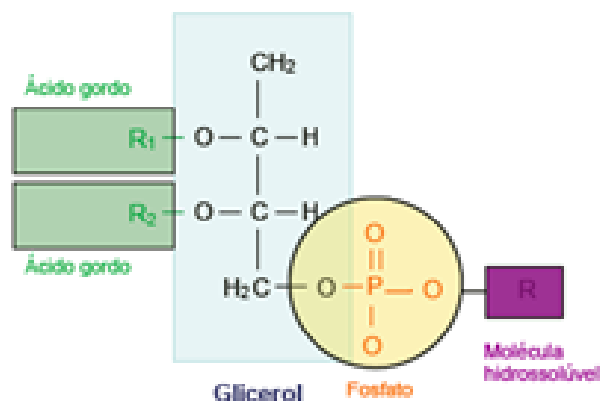


Figura 5 - Representação esquemática de um glicerofosfolípido (Adaptado de Barbosa, 1995).

O ácido fosfatídico (*Phosphatidic acid* – PA), que consiste em glicerol-3-fosfato cujas posições  $C_1$  e  $C_2$  são esterificadas com dois ácidos gordos, é o glicerofosfolípido mais simples, e precursor de todas as outras moléculas de glicerofosfolípidos. Os ácidos gordos encontrados neste subgrupo têm entre 16 a 20 carbonos. A posição  $C_1$  do glicerol é ocupada geralmente pelo ácido gordo saturado, e a posição  $C_2$  pelo ácido gordo insaturado. As classes de glicerofosfolípidos mais relevantes são as fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinosinol, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina (Motta, 2009).

A composição da membrana interna de *Escherichia coli*, que será o objeto de estudo, tem três classes principais em diferentes proporções. A distribuição média é estimada da seguinte forma: 75% de fosfatidiletanolamina (*Phosphatidylethanolamine* - PE), 20% de fosfatidilglicerol (*Phosphatidylglycerol* - PG) e 5% de cardiolipina (*Cardiolipin* - CL). Esta composição pode variar significativamente durante o ciclo celular (Dowhan, 2013).

## 2.2 Biossíntese de fosfolípidos em *Escherichia coli*

Em 1963 Kanfer e Kennedy aperceberam-se da escassez de informação sobre o processo de biossíntese de fosfolípidos em bactérias comparativamente ao que era conhecido para os mamíferos. Foi então que desenvolveram uma experiência na qual células de *E. coli* foram cultivadas na presença de um marcador molecular. A cada 30 minutos, de crescimento as células foram recolhidas para análise. A fração lipídica foi isolada e a incorporação do marcador nos produtos de desacilação alcalina de fosfolípidos foi quantificada após separação cromatográfica (Girotti, 2001).

Os fosfolípidos das fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidilglicerol (PG) foram detetados nos tempos iniciais de crescimento. A marcação de PA e fosfatidilserina diminuiu progressivamente com o passar do tempo tornando-se intermediários de outros fosfolípidos (Kanfer & Kennedy, 1964). A marcação em PE permaneceu estável em todas as gerações indicando que a porção de fosfato não se desdobrou noutros produtos (Hasin & Kennedy, 1984; Jackowski & Rock, 1986). Este facto explica-se porque o ácido gordo na posição *sn*-1 do PE faz a acilação do terminal – N do aminoácido da membrana externa da lipoproteína seguido de uma renovação do PE por aciltransferases específicas (Yoshimune et al., 2002). Também foi observado que a marcação de PG não foi estável durante a experiência, o que indica o seu desdobramento em produtos hidrossolúveis devido a degradação ou a outro composto de fosfato. Neste estudo as cardiolipinas não foram identificadas em *E.coli*.

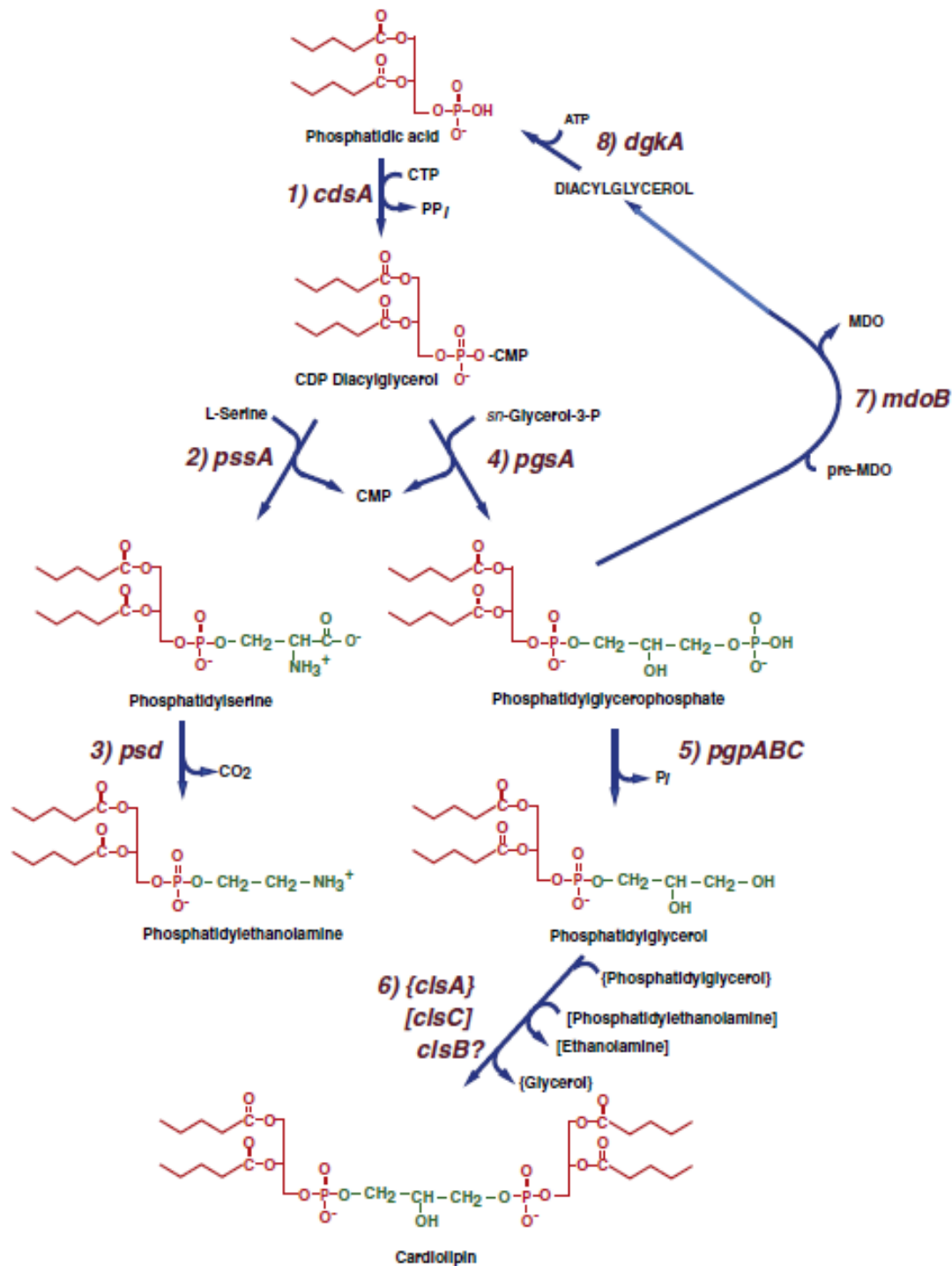


Figura 6 - Via de síntese de fosfolípidos em *Escherichia coli*. As enzimas numeradas realizam: 1) Síntese de CDP-diacylglicerol (*CdsA*); 2) Síntese de Fosfatidilserina (*PssA*); 3) Descarboxilase de Fosfatidilserina (*Psd*); 4) Síntese de Fosfatidilglicerofosfato (*PgsA*); 5) Fosfatase de Fosfatidilglicerofosfato (*Pgp*) codificada por três genes; 6) Síntese de Cardiolipina (*Cls*) codificada por três genes com um substrato PG nos três casos e um segundo substrato para [*ClsA*] e [*ClsC*] indicado pelos parênteses. Não foi definido o segundo substrato para *ClsB*; 7) Fosfatidilglicerol: Oligossacarídeo (MDO) derivado da pré-membrana sn-glicerol-1-P transferase (síntese de MDO); 8) Quinase de diacylglicerol (*DgkA*) (Adaptado de Dowhan, 2013).



### 3. Peroxidação lipídica

Diversas moléculas lipídicas que contém uma ou mais ligações duplas podem ser oxidadas quando expostas a condições específicas. Este fenómeno designa-se por peroxidação lipídica e os mecanismos que a induzem são complexos, mas semelhantes para a maioria destas moléculas quando sujeitas ao mesmo estímulo oxidativo. Os hidroperóxidos lipídicos são intermediários derivados de ácidos gordos insaturados, fosfolípidos, glicolípidos, colesterol e respetivos ésteres. A peroxidação lipídica pode ocorrer por reações enzimáticas ou não-enzimáticas que envolvem ROS, estes são responsáveis pelo efeito tóxico no meio onde se encontram através de vários danos que podem disseminar para outros locais e alterar também proteínas e ácidos nucleicos, uma vez que membrana perde a sua função de barreira, colocando a integridade dos organelos e da própria célula em risco ( Kappus, 1985; Girotti, 1990).

O mecanismo de peroxidação na bicamada membranar vai depender de um determinado número de fatores que incluem: (1) a localização do fotossensibilizador (se este se encontra na membrana ou na fase aquosa); (2) a constante de reação para reações do fotossensibilizador com o agente redutor, e do fotossensibilizador com o oxigénio e (3) a concentração relativa do agente redutor e do oxigénio nas imediações do fotossensibilizador.

Sem informação detalhada acerca do local de ligação do fotossensibilizador à membrana, pode ser difícil prever que tipo de reação ocorre, se do Tipo I ou do Tipo II. Um fotossensibilizador relativamente hidrofóbico em solução aquosa pode interagir com ele mesmo e promover o mecanismo do Tipo I (Foote, 1968). Esse emparelhamento é menos provável se o sensibilizador estiver associado à membrana (Girotti, 1990). Por outro lado, um fotossensibilizador acoplado à membrana pode facilmente ligar-se a um redutor adequado e favorecer a peroxidação do Tipo I. Este fenómeno já não acontece se qualquer um dos componentes (ou ambos) estiver disperso num compartimento aquoso. Por outro lado, a concentração de oxigénio molecular na bicamada lipídica é maior do que na água envolvente o que pode favorecer a química do Tipo II em vez do Tipo I (Valenzano, 1987). Os dois tipos de reação ocorrem geralmente em conjunto e é difícil avaliar o efeito fotobiológico exclusivo de diferentes radicais livres. Assim, é incerto saber

se o foto-dano está relacionado exclusivamente com o mecanismo do oxigénio singuleto, ou de radicais livres (Tanielian et al., 2000).

#### **4. Processo de fotoinativação bacteriana**

Pela reatividade dos lípidos em condições oxidativas, e uma vez que os lípidos são alvos preferenciais de oxidação por ROS, espera-se que estes sejam afetados de forma diferente, por PDI nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nos últimos anos têm sido testados vários derivados tetrapirrólicos, como FS, a fim de avaliar a sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Concluiu-se que fotossensibilizadores (porfirinas e flatocianinas) aniónicos ou neutros destroem eficazmente bactérias Gram-positivas, mas não têm capacidade de inativar de forma eficaz bactérias Gram-negativas, a menos que, seja induzido um aumento da permeabilidade da membrana externa através de um pré-tratamento com diferentes agentes químicos (Bertoloni et al., 1990) ou biológicos (Ehrenberg et al., 1993), tais como  $\text{CaCl}_2$ , EDTA ou polimixina B nonapeptídica que são capazes de promover a repulsão electroestática com destabilização da estrutura da parede celular (Ehrenberg et al., 1993; Jori & Brown, 2004). Esta diferença nos dois tipos de bactérias é explicada pela distinta arquitetura tridimensional da sua parede (Jori et al., 2001). A parede das bactérias Gram-negativas é revestida por lipopolissacarídeos (LPS) que dificulta a interação do fotossensibilizador com a membrana citoplasmática e oferece proteção contra agentes tóxicos exógenos. Esta camada de LPS representa uma barreira física e química através da qual os produtos gerados no exterior da célula necessitam de passar para interagir com os alvos vitais, isto é, a membrana e os componentes citoplasmáticos (Dahl et al., 1989). A maioria das bactérias Gram-positivas é mais suscetível a PDI porque não possui uma estrutura protetora homóloga ao LPS das bactérias Gram-negativas (Figura 7).

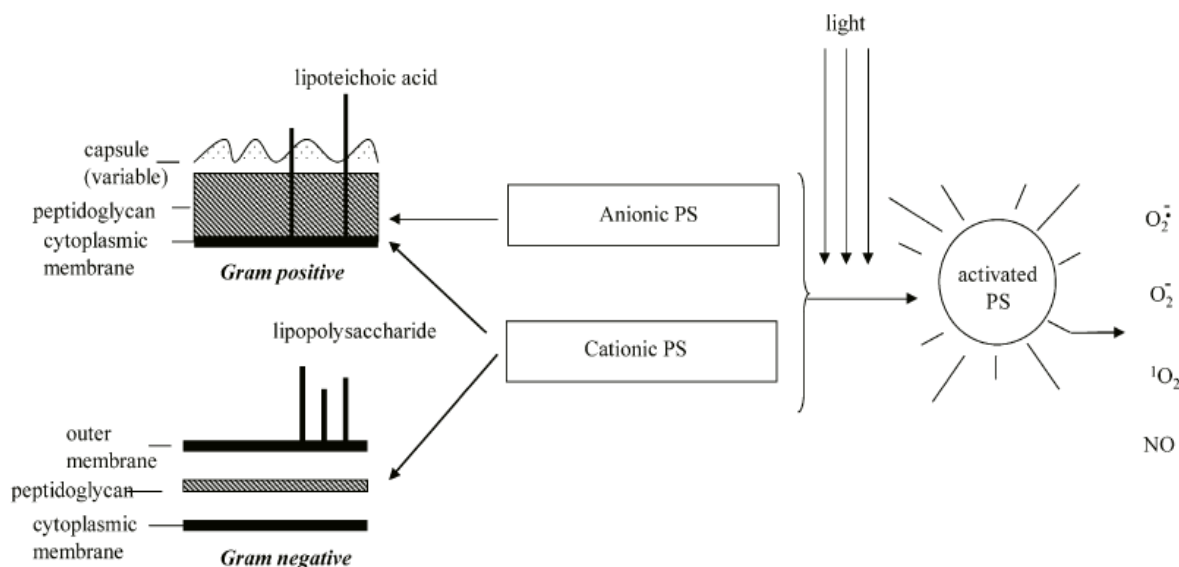


Figura 7 - Representação esquemática de PDI em Gram-positivas e Gram-negativas. O fotossensibilizador na presença de luz produz espécies de oxigênio tóxicas. Fotossensibilizadores aniônicos (ou neutros) são normalmente ativados apenas contra bactérias Gram-positivas uma vez que não podem atravessar a membrana das Gram negativas que está carregada negativamente. Fotossensibilizadores catiónicos podem inativar bactérias Gram positivas e Gram-negativas. (Adaptado de O’Riordan et al., 2005) Uma vez ativado pela luz o fotossensibilizador gera espécies de oxigênio ativas que podem modificar muitas moléculas biológicas e conduzir à morte celular (Ergaieg et al, 2008).

As porfirinas catiónicas têm mostrado ser eficazes na fotoinativação direta das bactérias Gram-negativas sem a presença de agentes de permeabilização adicionais (Nitzan & Ashkenazi, 2001). A carga positiva da molécula fotossensibilizadora parece promover uma forte interação eletrostática com os locais carregados negativamente da superfície externa das bactérias Gram-negativas, aumentando a eficácia no processo de fotoinativação (Caminos et al., 2006). As porfirinas podem ser transformadas em entidades catiónicas através da inserção de substituintes carregados positivamente nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico que afetam a cinética e a extensão da ligação a células bacterianas. O grau hidrofóbico da cada porfirina pode ser modulado pelo número de grupos catiónicos (até quatro em porfirinas meso-substituídas) ou pela inserção de cadeias hidrocarbonadas de diferentes tamanhos.

A distribuição de carga assimétrica nas posições periféricas das porfirinas, cargas catiónicas combinadas com grupos altamente lipofílicos (ex: grupos trifluorometil), a

introdução de grupos laterais de hidrocarbonetos aromáticos e a modulação do número de cargas positivas do fotossensibilizador, representam alguns dos eventos que aumentam o carácter anfifílico das porfirinas. Um aumento do carácter anfifílico do FS aumenta a sua afinidade para as bactérias e consequentemente, melhora a sua acumulação nas células, acompanhado de um aumento da sua atividade fototóxica (Alves et al., 2009). Estudos recentes de viabilidade celular demonstram a eficácia na inativação bacteriana utilizando porfirinas catiónicas como fotossensibilizadores (Merchat et al., 1996; Spesia et al., 2005; Alves et al., 2008; Alves et al., 2009).

Outras investigações apontam os lípidos como alvos de PDI em bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Alves et al., 2013b). No entanto, tendo em conta a variabilidade estrutural das bactérias e as diferentes condições em PDI, o número de trabalhos existente é muito reduzido. É necessário obter mais detalhes sobre o mecanismo de inativação bacteriana via PDI envolvendo os lípidos para poder avaliar e provar a eficácia desta terapia em diferentes condições com diferentes fotossensibilizadores.

## 5. Objetivo do trabalho

Pretende-se com este trabalho avaliar o efeito do processo de fotoinativação nos lípidos membranares de *Escherichia coli* em diferentes tempos de exposição, utilizando fotossensibilizadores com diferentes cargas positivas e diferente distribuição de carga. A extensão da inativação bacteriana será avaliada através da quantificação de LOOH pelo método FOX e análise da variação do perfil de ácidos gordos saturados e insaturados. Para compreender melhor o processo de foto-oxidação, e com vista a assegurar os resultados obtidos foi desenvolvido um sistema modelo *in vitro* utilizando um padrão de fosfatidiletanolamina (PE), uma vez que esta é a classe de fosfolípidos mais abundante em *Escherichia coli*. A monitorização da oxidação foi feita por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS). Avaliou-se o efeito da concentração de FS com diferentes tempos de exposição em 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE).

## **II. Material e Métodos**



## 1. Ensaio de fotoinativação bacteriana

### 1.1 Estirpe bacteriana e condições de crescimento.

*Escherichia coli* ATC<sup>®</sup> 13706<sup>™</sup> (VA, USA) previamente armazenada a 4 °C em meio sólido TSA, foi inoculada em 10 mL de meio líquido de caldo de soja triptica (TSB, Merck) a 37 °C, sem agitação, durante 18 horas. Para o ensaio de fotoinativação transferiu-se assepticamente 900 µL da cultura para 180 mL de meio líquido TSB. A bactéria cresceu na estufa a 37 °C sem agitação durante 12 horas até atingir uma densidade ótica (DO<sub>600</sub>) ~ 1,5 correspondente  $\approx 10^8$  unidades formadoras de colônia (CFU) mL<sup>-1</sup>.

A cultura bacteriana foi centrifugada a 13000xg durante 10 minutos, a 4°C, em centrífuga de alta velocidade (Avanti<sup>®</sup> J-25, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). O pelete bacteriano recolhido foi sujeito a três lavagens com 10 mL de solução tampão PBS (pH 7,4). O pelete foi ressuspensionado em 15 mL de solução tampão PBS.

### 1.2 Fotossensibilizadores

Para o ensaio de foto-oxidação, foram utilizados como fotossensibilizadores, as porfirinas tri-iodeto de 5-(1-metilpiridínio-4-il)-10,15,20-tris(pentafluorofenil) porfirina (Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF), di-iodeto de 5,10-bis(1-metilpiridínio-4-il)-15,20-bis(pentafluorofenil) porfirina (Di-Py<sup>+</sup>-Me-Di-PF<sub>adj</sub>), di-iodeto de 5,15-bis(1-metilpiridínio-4-il)-10,20-bis(pentafluorofenil) porfirina (Di-Py<sup>+</sup>-Me-Di-PF<sub>opp</sub>), Tri-iodeto de 5,10,15-(1-metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil) porfirina (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) e tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il) porfirina (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 8.

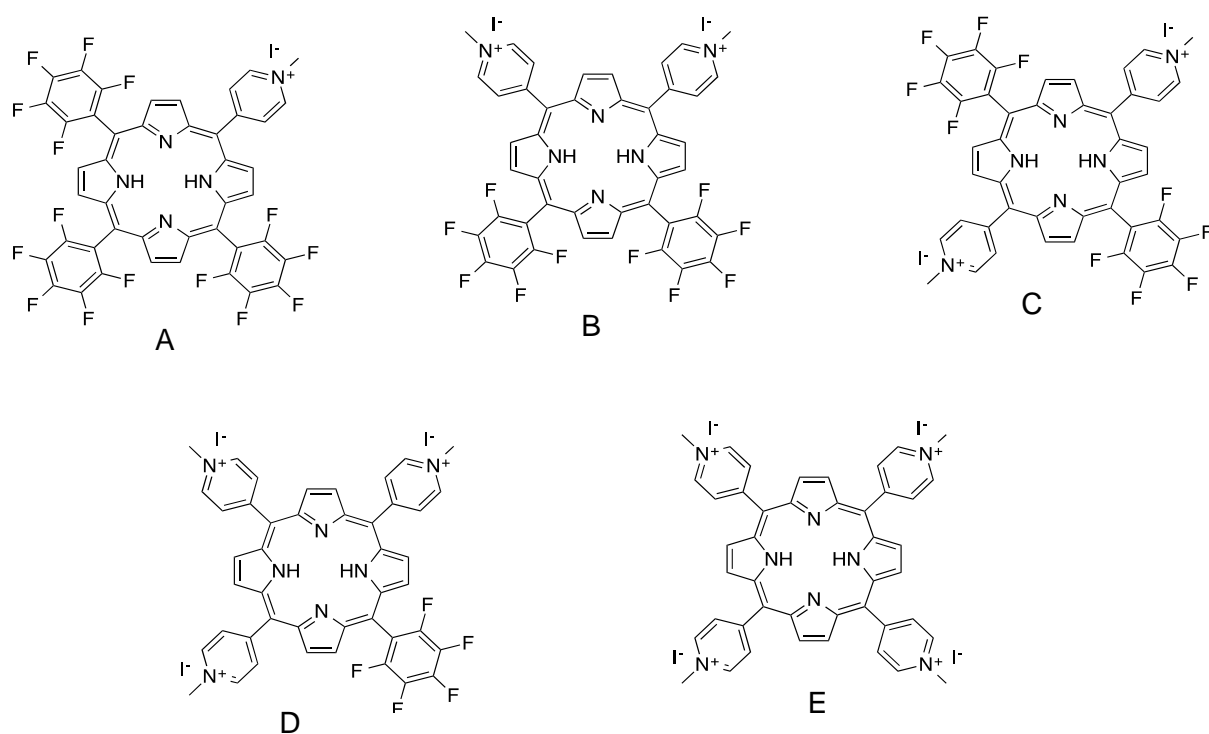


Figura 8 - Representação da estrutura das porfirinas utilizada como fotossensibilizador na inativação de *Escherichia coli*. (A) Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF, (B) Di-Py<sup>+</sup>-Me-Di-PF<sub>adj</sub>, (C) Di-Py<sup>+</sup>-Me-Di-PF<sub>opp</sub>, (D) Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, (E) Tetra-Py<sup>+</sup>-Me.

A pureza destes compostos foi confirmada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton. Foram ainda adquiridos espectros de absorção para cada uma das porfirinas (Figura 9) que revelaram uma banda Soret característica na região dos 400 nm.

Antes de serem utilizados foram preparadas soluções stock (concentração 500 µM) de cada porfirina usando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Todas as porfirinas foram sonicadas à temperatura ambiente durante 30 minutos antes de serem utilizadas, de modo a garantir a completa solubilização da porfirina.



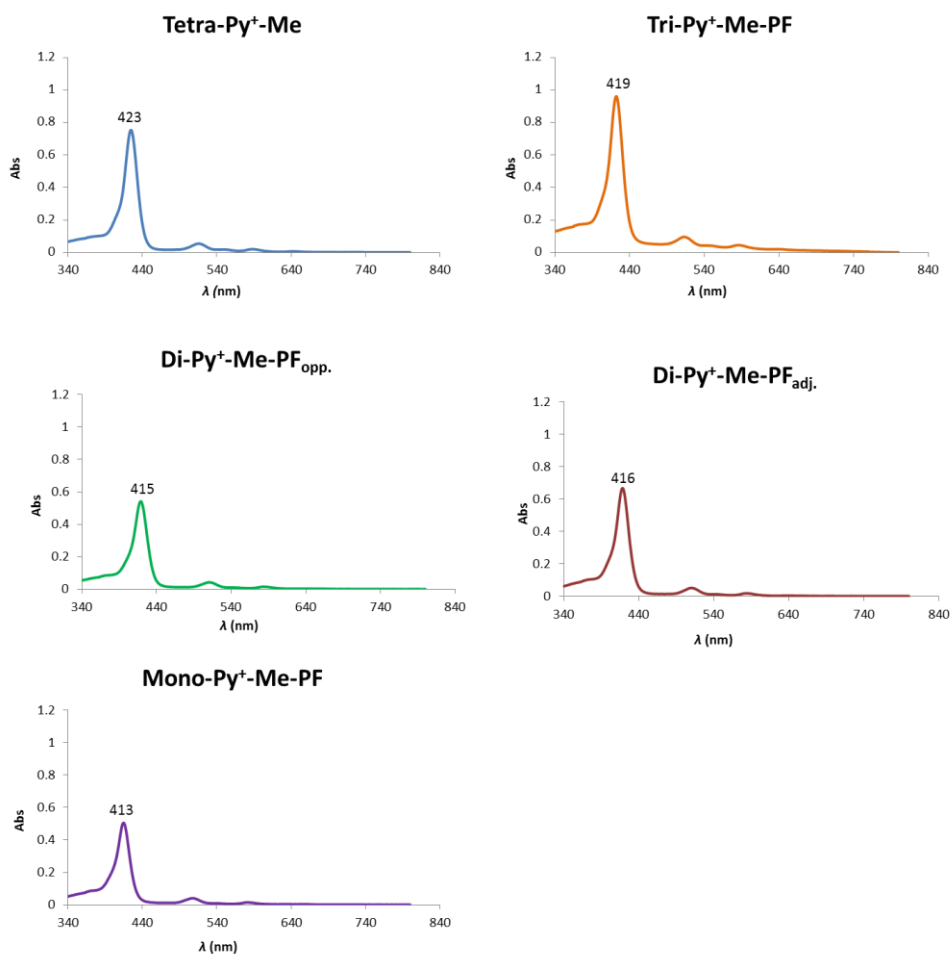


Figura 9 – Espectros de absorção de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub>, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> e Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF.

### 1.3 Irradiação das culturas

As células bacterianas foram transferidas para três copos de vidro esterilizados de 600 mL. Perfez-se o volume de 60 mL em cada copo: controlo claro (5 mL de células ressuspendidas em PBS, 54,5 mL de PBS), controlo escuro (5 mL células ressuspendidas em PBS, 54,4 mL de PBS e 600 µL de porfirina, copo protegido com papel de alumínio) e amostra (5 mL de células ressuspendidas em PBS, 54,4 mL de PBS e 600 µL de porfirina). A concentração final de porfirina no copo da amostra e no controle escuro foi de 5 µM.

Os copos foram incubados no escuro durante 10 minutos, sob agitação (100 rpm) de modo a promover a ligação do fotossensibilizador às células. As soluções presentes

nos copos foram irradiadas com luz branca artificial (radiação PAR, 380-700 nm, 13 OSRAM com 21 lâmpadas de 18 W cada) e agitados a 100 rpm, durante 90 e 270 minutos.

As células foram centrifugadas (10 minutos, 13000xg a 4 °C) e o sobrenadante foi rejeitado. O pelete foi ressuspensionado em 2 mL de água Milli-Q e transferido para tubos de vidro PIREX® com uma mistura de 7,5 mL de clorofórmio:metanol (2:1, V/V). Os tubos foram homogeneizados através de várias inversões vigorosas e permaneceram durante a noite em gelo até à extração lipídica.

## **2. Extração lipídica**

Para extração de lípidos bacterianos seguiu-se o método *Bligh and Dyer* modificado. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm (*Mixtasel, JP Selecta S.A., Barcelona, Espanha*), à temperatura ambiente. Após centrifugação, a fase aquosa (em cima) foi rejeitada e a fase orgânica (em baixo), na qual se encontram os lípidos, foi recolhida para um novo tubo PIREX® lavado. Este processo foi repetido mais duas vezes, de modo a recolher a maior quantidade de lípidos possível. Os extratos lipídicos resultantes foram completamente secos em corrente de azoto, dissolvidos em 300 µL de clorofórmio e armazenados a -20 °C em frascos de âmbar de 2 mL.

## **3. Quantificação de fosfolípidos**

Os extratos lipídicos (10 µl) foram colocados em tubos de vidro previamente lavados em ácido, aos quais se adicionou ácido perclórico concentrado (0,5 mL, 70% m/v). A mistura foi incubada durante 60 minutos a 180 °C num bloco de aquecimento (*Block Heater SBH200D/3, Stuart®, Bibby Scientific Ltd., Stone, UK*), de modo a clivar a cabeça de fosfato dos fosfolípidos. Após o período de incubação, foram adicionados pela seguinte ordem: 3,3 mL de água *Milli-Q*, 0,5 mL de molibdato de amónio (2,5%) e 0,5 mL de ácido ascórbico (10%). Entre cada adição a mistura foi agitada num vortex, de modo a ficar bem homogeneizada. Seguiu-se uma incubação de 10 minutos, a 100 °C num banho de água (*Precistern, JP Selecta S.A., Barcelona, Spain*).

Paralelamente a este processo, foram preparados padrões de fosfato com concentrações entre 0,1 e 2 µg, a partir da solução padrão de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 µg mL<sup>-1</sup> de fosfato). Estes foram submetidos ao mesmo tratamento das amostras, com a exceção da etapa no bloco de aquecimento. A absorvância das soluções correspondentes aos padrões e amostras foi medida a 800 nm, à temperatura ambiente, num espectrofotómetro UV-Vis de microplacas (*Multiskan GO, Thermo Scientific, Hudson, NH, USA*). A quantidade de fósforo das amostras foi obtida por regressão linear, através do gráfico que relaciona a quantidade de fósforo presente nos padrões e a média da absorvância obtida a partir dos duplicados nas várias concentrações. A quantidade de fosfolípidos foi obtida multiplicando a quantidade de fósforo por vinte e cinco.

#### 4. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos presentes nos extratos lipídicos totais foram quantificados através de FOX 2 (*ferrous oxidation-xylene orange*). Em eppendorfs previamente lavados, foram adicionados 50 µL de extrato lipídico total (controlos e amostras) e 950 µL de reagente FOX 2. Paralelamente, foram feitos padrões de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com concentrações entre 0 e 0,8 mM ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, reagente de FOX2 e água).

As misturas foram homogeneizadas no vortex, deixadas durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente para ocorrer a reação de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$  por ação dos hidroperóxidos em condições ácidas. Os iões  $\text{Fe}^{3+}$  foram detetados pela presença do xilenol que é um indicador da presença destes iões. A absorvância foi lida a 560 nm num espectrofotómetro UV-Vis de microplacas (*Multiskan GO, Thermo Scientific, Hudson, NH, USA*), e a quantidade de hidroperóxidos foi calculada por regressão linear resultante do gráfico que relaciona a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dos padrões e respetiva média da sua absorvância.

Na preparação do reagente FOX2 (100 mL) foram dissolvidos 250 µM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (9,8 mg) e 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (139 µL) em 5 mL de água. De seguida, foram adicionados 4 mM 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenolhidroxitolueno butilado (BHT) (88,2 mg), 100 µM de laranja de xilenol (7,2 mg) e 45 mL de metanol. Juntou-se mais 45 mL de metanol e 5 mL de água.

## 5. Análise de ácidos gordos por cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID)

A fim de identificar o perfil de ácidos gordos de cada amostra, utilizou-se aproximadamente 40 µg de fosfolípido que foram convertidos nos respetivos ésteres metílicos, adicionando ao extrato lipídico hexano (1 mL) e uma solução de hidróxido de potássio (KOH 200 µL, 2,0 M) em metanol. Homogeneizaram-se muito bem as amostras no vortex durante aproximadamente 3 minutos. Adicionou-se uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl 2 mL), seguindo-se uma centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, de modo a formar 2 fases. A fase orgânica foi recolhida para um novo tubo e seca em corrente de azoto. Ao tubo já seco, de forma a ressuspender os ésteres metílicos, adicionou-se hexano (20 µL), e foram injetados 4 µL para análise no GC.

O injetor de GC foi programado a 250 °C e o detetor a 270 °C. O tempo de análise comportou aproximadamente 19 minutos, nos quais a temperatura do forno foi variada em 3 rampas (50 °C, 180 °C e 260 °C). O cromatógrafo de gás (*Clarus 400, PerkinElmer, Inc., MA, USA*) foi equipado com uma coluna DB-1 com 30 m de comprimento e um detetor de ionização de chama de 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme (*J&W Scientific, Agilent Technologies, Folsom, CA, USA*). O gás usado foi o hidrogénio a um caudal de 1,7 mL min<sup>-1</sup>.

As concentrações relativas dos ácidos gordos foram calculadas através da área percentual com normalização adequada, considerando a soma de todas as áreas dos ácidos gordos identificados. Foi utilizado o programa *Total Navigator Software* para aquisição e tratamento dos dados.

## 6. Estudo do efeito fotodinâmico em 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE)

### 6.1 Irradiação de POPE

A 3 copos de vidro de 50 ml esterilizado foram adicionados 37,5 µg de solução padrão POPE, hidrogenocarbonato de amónia (5mM, pH 7,4) e porfirina, de modo a perfazer as concentrações de 2,5 µM, 5 µM e 10 µM. As misturas foram sonicadas durante 5 minutos de modo a libertar os lipossomas e irradiadas durante 90 e 270 minutos. Paralelamente, também foi irradiado, durante o mesmo intervalo de tempo, um controlo no qual a solução de porfirina foi substituída pelo tampão de hidrogenocarbonato de amónia. Após irradiação, as amostras foram mantidas em gelo até à extração de lípidos.

### 6.2 Extração lipídica

A extração de fosfolípidos do POPE foi realizada em tubos de vidro PIREX® aos quais se juntou a solução irradiada e uma mistura de clorofórmio:metanol:água nas proporções 8:4:1 (v/v/v). A mistura foi bem homogeneizada no vortex, seguindo-se uma centrifugação durante 10 minutos a 2000 rpm. A fase orgânica foi recolhida para um novo tubo, e seca em corrente de azoto. Os extratos foram ressuspensos em clorofórmio e armazenados a -20 °C em frascos de âmbar de 2 mL.

### 6.3 Análise por espectrometria de massa (MS)

A análise de padrões POPE foi realizada por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) e análise por espectrometria de massa tandem (MS/MS) no modo negativo, num espectrómetro de massa *LXQ linear ion trap* (ThermoFischer, Finnigan <sup>TM</sup>, San Jose, CA, USA). A fonte de *electrospray* possuía as seguintes condições: temperatura do capilar de 275 °C, voltagem do *electrospray* de 4,7

kV e fluxo de gás de 25 unidades. Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos com um tempo máximo de ionização de 50 ms e 200 ms, respetivamente. A energia de colisão variou entre 16 e 25 (unidades arbitrárias) para as experiências de MS/MS. Foi utilizado o programa *Xcalibur data system (V2.0)* para aquisição e análise dos dados recolhidos.

## **7. Análise estatística**

A quantificação de fosfolípidos e de hidroperóxidos foi realizada de forma independente e em triplicado para amostras e controlos (n=3) considerando o valor das médias  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando um método de variância simples (one-way ANOVA) para comparação entre valores com teste post-hoc Bonferroni. A análise estatística foi feita recorrendo ao programa *PRISM® GraphPad Software, Inc.* (La Jolla, CA, USA) e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **III. Resultados e Discussão**





## 1. Estudo da foto-oxidação lipídica em *Escherichia coli*.

O estudo do efeito da foto-oxidação ao nível dos lípidos membranares de *E.coli* foi feito inicialmente recorrendo ao método de FOX 2. Este método é utilizado para medir a quantidade de hidroperóxidos no extrato lipídico e baseia-se na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$  induzida pela presença de hidroperóxidos em condições ácidas (reação 1). Nestas condições, os iões férricos depois de reagirem com xilenol geram um complexo azul-violeta, com absorvância máxima de 550-600 nm. Assim, os iões férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) são quantificados pela absorvância UV a 560 nm (reação 2).



O efeito da foto-oxidação na peroxidação lipídica foi avaliado utilizando um outro método, baseado na análise e quantificação de ácidos gordos do extrato lipídico total por GC-FID. Esta análise permite determinar a quantidade relativa de cada ácido gordo. Assim, por GC-FID avaliou-se a variação entre a quantidade de ácidos gordos insaturados e a sua possível diminuição em consequência da peroxidação lipídica. Para a análise de ácidos gordos por GC-FID, os fosfolípidos foram hidrolisados para libertar os seus ácidos gordos ligados nas posições do *sn-1* e *sn-2* do glicerol. Os ácidos gordos libertados em meio alcalino e na presença de metanol sofrem metilação do ácido carboxílico para formar ésteres metílicos de ácidos gordos. Estes ésteres voláteis são depois detetados e quantificados utilizando cromatografia gasosa capilar, com deteção por ionização de chama (GC-FID). Utilizando este método apenas os ácidos gordos não-modificados são detetados. Os ácidos gordos oxidados não são detetados por este método.

### 1.1 Quantificação de hidroperóxidos

Para avaliar o efeito oxidativo em fosfolípidos das membranas de *Escherichia coli*, e estimar a eficácia do fotossensibilizador foi feita a quantificação dos hidroperóxidos lipídicos usando o método FOX 2. Na Figura 10 são apresentados os resultados da quantificação de LOOH nas amostras de extratos lipídicos de *E. coli* e nos controlos (claro e escuro) após irradiação com as cinco porfirinas durante 90 (barra branca) e 270 minutos (barra laranja). Os resultados apresentados foram obtidos em triplicado e em dias diferentes de modo a avaliar a reprodutibilidade (Figura 10).

Verificou-se que a concentração de LOOH no controlo claro e no controlo escuro é inferior aquela observada nas amostras irradiadas, com valores significativos para Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp</sub> e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj</sub>. ( $p < 0,001$ , Teste Bonferroni). Este fenómeno vem apoiar os princípios básicos da terapia fotodinâmica, isto é, o foto-dano ocorre com a presença do fotossensibilizador e de luz em simultâneo. Só a presença de luz (controlo claro) ou só a presença do fotossensibilizador (controlo escuro) não é suficiente para a oxidação lipídica e consequentemente para a inativação bacteriana.

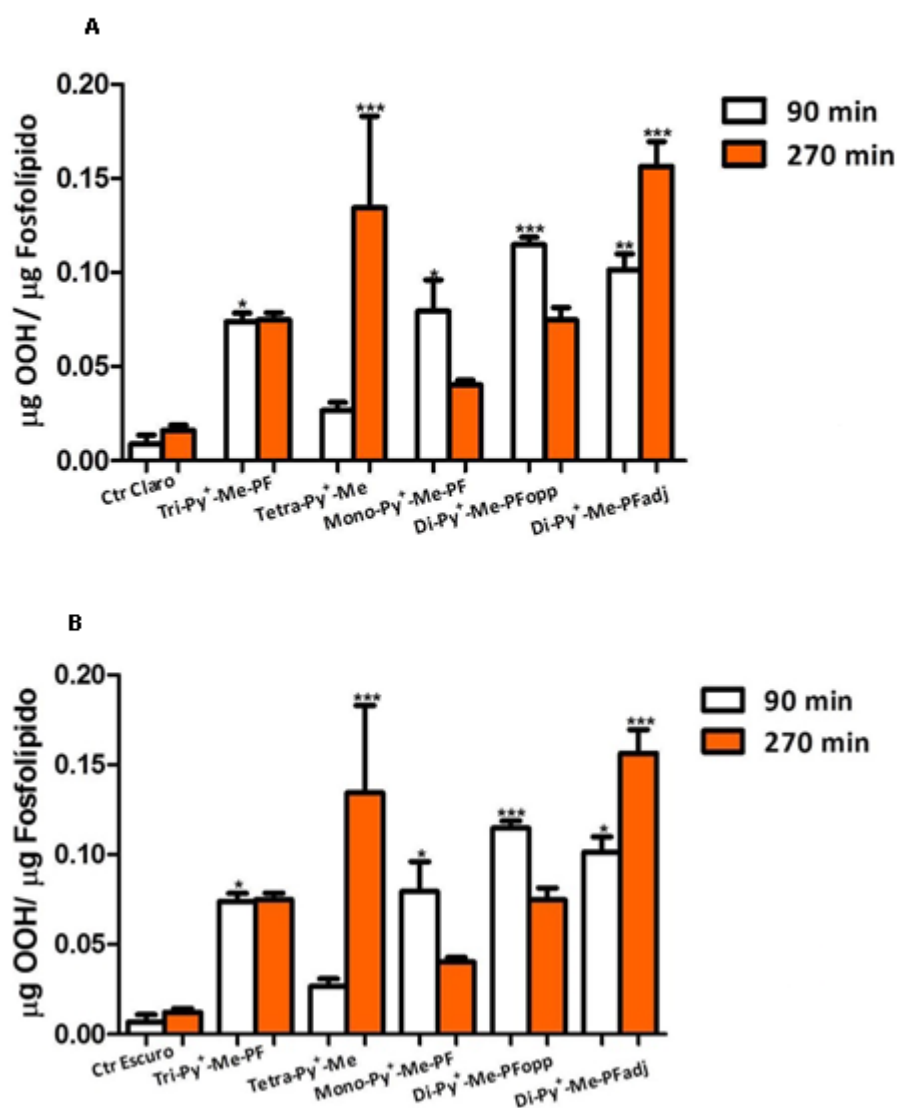


Figura 10 - Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de *Escherichia coli* após irradiação durante 90 e 270 minutos com as porfirinas Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF adj., Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF opp., Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me utilizando o método de FOX 2, onde (A) representa o controle claro e as porfirinas testadas e (B) representa o controle escuro e as porfirinas testadas. Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão, e diferença significativa \*\*\* (p<0.001), \*\* (p<0.01) e \* (p<0,05) entre controle claro e amostras (A) e controle escuro e amostras (B).

Após irradiação com qualquer uma das porfirinas em ambos os tempos (90 e 270) houve oxidação dos lípidos em *E. coli*. As maiores quantidades de LOOH foram obtidas nos ensaios realizados com Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me após 270 minutos, o que sugere que estes são bons fotossensibilizadores. Esta oxidação é muito maior do que para o tempo de 90 minutos nas mesmas porfirinas. As porfirinas menos ativas aos 270 minutos são a Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub> Curiosamente, estas mostram maior formação de LOOH aos 90 minutos, e a partir deste tempo, a quantidade de LOOH decresce. Este decréscimo diz-nos que houve degradação de LOOH e que não está a haver formação de novos hidroperóxidos em grandes quantidades.

A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF parece ser aquela que leva à formação de quantidade de LOOH intermédia e não se comporta de acordo com os dados existentes na literatura (Alves et al., 2013c). Este fenómeno pode ter a ver com a metodologia utilizada, o que foi confirmado através do uso de métodos alternativos ao método de FOX 2.

Os hidroperóxidos lipídicos são os primeiros produtos de oxidação dos lípidos, mas estes compostos podem ser degradados na presença de iões metálicos, dando origem a outros produtos de oxidação nomeadamente derivados hidroxilados e ceto, que não são quantificados pelo método de FOX 2. Além disso, os resultados de outros autores indicam que este método não é específico para hidroperóxidos e que devem ser tomadas precauções quando este método é utilizado para analisar lípidos altamente oxidados (Yin & Porter, 2003). Assim, apesar do método FOX 2 nos permitir detetar que todos os fotossensibilizadores afetam os lípidos bacterianos nas condições utilizadas, este método é adequado apenas para comprovar a peroxidação lipídica, não sendo adequado para estimar a eficácia dos fotossensibilizadores. Existem, no entanto, outros métodos que quantificam a extensão de oxidação de lípidos, como a quantificação de ácidos gordos insaturados.

## 1.2 Avaliação da variação do perfil de ácidos gordos em extratos lipídicos de *E. coli* após foto-oxidação

A percentagem relativa dos ácidos gordos dos extratos lipídicos totais do controlo claro e das amostras irradiadas durante 90 e 270 minutos com cada um dos fotossensibilizadores, por GC-FID é apresentada na Figura 11. Identificaram-se, por análise dos cromatogramas, os ácidos gordos C14:0, C16:1, C16:0, Cy17:0, C18:1 n9c, C18:0 e Cy19:0, todos eles já identificados na literatura (Hsu & Turk, 2006).

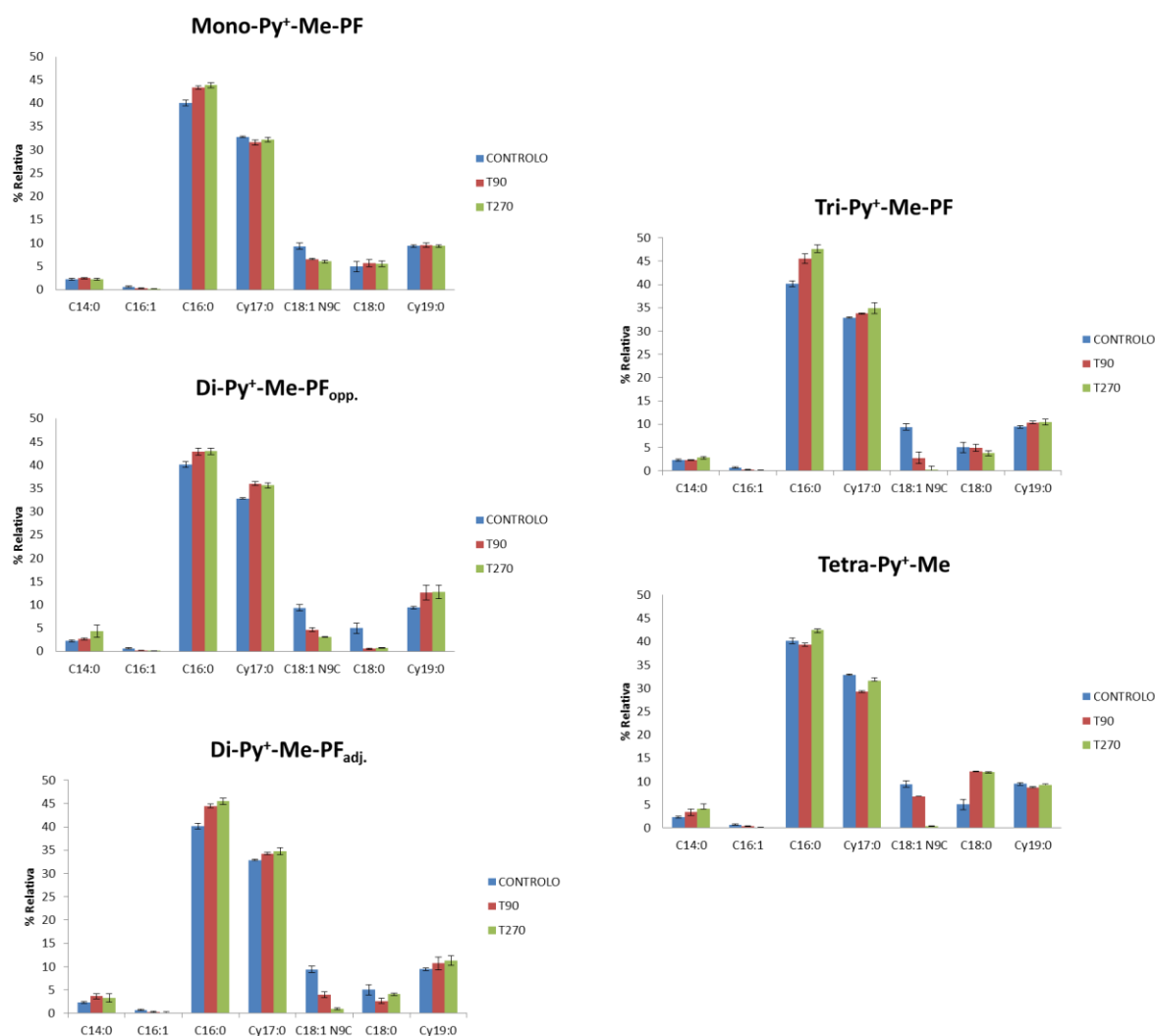


Figura 11 - Percentagem relativa de ácidos gordos encontrados em *E. coli* após irradiação durante 90 e 270 minutos com Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub>, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub>, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me.

Comparando o controlo com as amostras irradiadas nos diferentes tempos é possível observar diferenças na percentagem relativa de cada um dos ácidos gordos. Houve um aumento da quantidade relativa de C16:0 e uma redução no teor relativo de espécies monoinsaturadas C16:1 e C18:1 n9c. Esta tendência é diretamente proporcional ao tempo de irradiação, isto é, quanto maior o tempo de exposição maior a percentagem de espécies saturadas e menor a quantidade de espécies insaturadas. A diminuição dos ácidos gordos monoinsaturados deve-se a modificações provocadas pela oxidação dos mesmos, observando-se que quanto mais eficiente é o fotossensibilizador, maior a oxidação do ácido gordo insaturado e menor a sua concentração relativa. O facto de estes diminuírem em quantidade relativa faz com que não sejam quantificados pelo GC-FID, fazendo com que a quantidade relativa de ácidos gordos saturados aumente. Este efeito é variável e dependente do tipo de fotossensibilizador utilizado. Assim, para melhor visualizar o impacto de cada porfirina na variação da insaturação vs saturação de ácidos gordos foi representada esquematicamente a variação do somatório de todos os ácidos gordos saturados vs insaturados (Figura 12).



Figura 12 – Quantificação do perfil de ácidos gordos. Controlo; (A<sub>1</sub>) Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF – 90 Minutos; (A<sub>2</sub>) Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF – 270 Minutos; (B<sub>1</sub>) Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub> – 90 Minutos; (B<sub>2</sub>) Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub> – 270 Minutos; (E<sub>1</sub>) Tetra-Py<sup>+</sup>-Me – 90 Minutos; (E<sub>2</sub>) Tetra-Py<sup>+</sup>-Me – 270 Minutos; (C<sub>1</sub>) Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> – 90 Minutos; (C<sub>2</sub>) Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> – 270 Minutos; (D<sub>1</sub>) Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF – 90 Minutos; (D<sub>2</sub>) Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF – 270 Minutos.

Verificou-se que houve uma diminuição dos ácidos gordos insaturados comparativamente com o controlo (Figura 12). A diminuição dos ácidos gordos mono insaturados resulta das modificações provocadas pela oxidação dos ácidos gordos insaturados que fazem parte dos fosfolípidos, o que corrobora a ocorrência de peroxidação lipídica após fotossensibilização. Verificou-se que, dependendo do fotossensibilizador utilizado, a relação de ácidos gordos saturados e insaturados é variável. A análise da diminuição dos ácidos gordos sugere a seguinte ordem crescente de eficiência para os fotossensibilizadores testados: Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF < Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub> < Tetra-Py<sup>+</sup>-Me < Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> < Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. Estes dados estão de acordo com estudos de viabilidade celular em que foram testados os mesmos fotossensibilizadores nas mesmas condições (dados não publicados). Curiosamente, ao contrário dos resultados do FOX 2, por este método a maior variação observada foi para a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, indicando que este é o melhor sensibilizador. Estes dados estão também em concordância com resultados já publicados que comparam a eficácia de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (Alves et al., 2013a).

Como a escolha do fotossensibilizador a usar na terapia fotodinâmica é um fator chave, é importante desenvolver métodos que permitam avaliar a eficiência do FS na inativação bacteriana. No âmbito deste trabalho, foi desenvolvido um método simples para avaliar a eficiência dos FS, utilizando um fosfolípidos padrão como sistema modelo, que mimetizam a composição principal das membranas bacterianas.



## 2. Estudo fotodinâmico em 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE)

Como os resultados deste estudo mostraram que os lípidos das membranas bacterianas são afetados durante a terapia fotodinâmica, e como as fosfatidiletanolaminas (PE) monoinsaturadas são os lípidos mais abundantes nas membranas celulares bacterianas Gram-negativas (Melo et al., 2013), foi avaliado o efeito dos 5 sensibilizadores em sistemas modelo utilizando lipossomas desta classe de lípidos.

A oxidação de lípidos foi avaliada por espectrometria de massa (MS) com ionização por *electrospray* (ESI-MS) em modo negativo. Os espectros de MS das misturas reacionais de fosfatidiletanolaminas foram adquiridos para todos os fotossensibilizadores estudados em sistemas separados, em diversos tempos e concentrações para avaliar o efeito destas duas variáveis numa possível foto-inativação bacteriana.

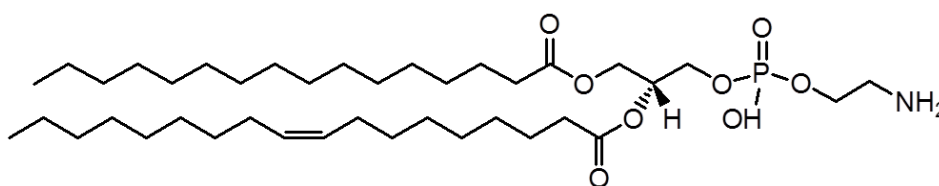


Figura 13 - Estrutura química da POPE.

A POPE (Figura 13) foi escolhida porque as fosfatidiletanolaminas (PE) representam os fosfolípidos mais abundantes em *E. coli*, assim como os ácidos gordos monoinsaturados. De modo a identificar os principais produtos de oxidação formados, optou-se por apresentar apenas os espectros ESI-MS adquiridos em modo negativo da POPE irradiada com dois fotossensibilizadores, Try-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF, pois consideramos estes como o mais e o menos eficaz, respetivamente, no processo de fotoinativação, sendo os seus espectros representativos de todas os outros fotossensibilizadores testados. A POPE não modificada, foi identificada como iões [M-H]<sup>-</sup> a m/z 716,4 no espectro ESI-MS da Figura 14.

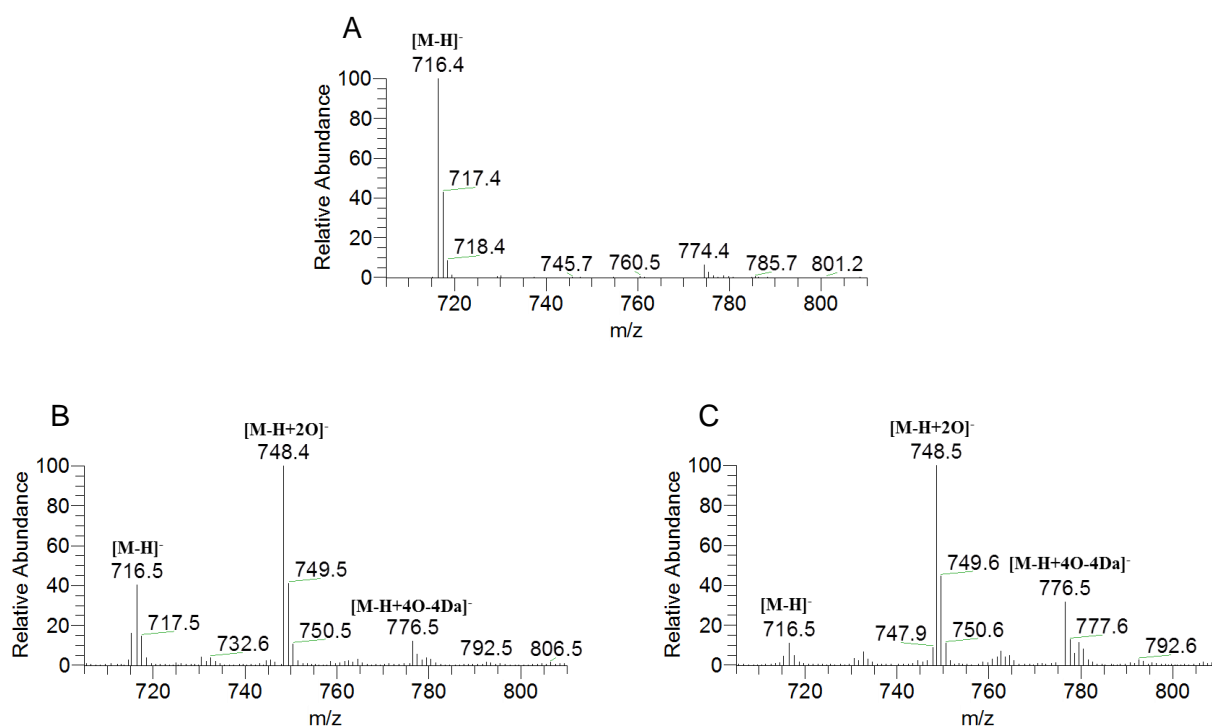


Figura 14 - Espectro ESI-MS da POPE não modificada (A) e irradiada durante 270 minutos a uma concentração de 5  $\mu$ M na presença de Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF (B) e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (C).

Através da comparação dos espectros ESI-MS da POPE não irradiada e irradiada durante 90 e 270 minutos (Figura 14) foi possível observar novos iões, com valores a  $m/z$  superiores ao da POPE não modificada, nos espectros obtidos na presença de FS (Melo et al., 2013). Estes novos iões poderão corresponder a produtos de oxidação da POPE formados por inserção de um a quatro átomos de oxigênio que levam à formação de derivados ceto (POPE + O - 2 Da), hidroxilo (POPE + O) e hidroperóxido (POPE + 2O). Pela análise dos espectros da POPE irradiada, podemos ainda observar a presença de novos iões a  $m/z$  730 (POPE + O - 2Da), 732 (POPE + O), 748 (POPE + 2O), 762 (POPE + 3O - 2 Da), 764 (POPE+ 3O), 776 (POPE + 4O - 4Da) e 780 (POPE + 4O), correspondentes a produtos de oxidação de cadeia longa da POPE. Os produtos a  $m/z$  748 são os principais produtos de oxidação observados durante a fotossensibilização da POPE, os quais correspondem aos derivados do tipo hidroperóxido. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Kim e colaboradores para a foto-oxidação de cardiolipinas na presença de uma ftalocianina (Pc 4). Neste estudo, os hidroperóxidos e di-hidroperóxidos

de cardiolipina foram identificados como sendo os produtos principais da foto-oxidação das cardiolipinas (Kim et al., 2010; Rodriguez et al., 2010).

Para confirmar que de facto estes novos iões correspondem a produtos de oxidação da POPE, e para uma boa caracterização dos mesmos, procedeu-se à análise por espectrometria de massa *tandem* (ESI- MS/MS) (Figura 15). Na Figura 15-A está representado o espectro ESI-MS/MS da POPE não modificada a  $m/z$  716,5. Pela análise da figura, podemos observar a presença de iões produtos a  $m/z$  255,2 e 281,2 que correspondem aos aniões carboxilato dos ácidos gordos na posição *sn-1* e *sn-2*, respetivamente. É possível observar os iões fragmento que correspondem as perdas dos ácidos gordos na forma ceto, a  $m/z$  452,4 (*sn-2*) e 478,4 (*sn-1*) e na forma ácido, a  $m/z$  434,4 (*sn-2*) e 460,3 (*sn-1*).

Na Figura 15-B está representado o espectro ESI-MS/MS correspondente ao produto de oxidação da POPE formado pela adição de 2 átomos de oxigénio na forma de um derivado hidroperóxido a  $m/z$  748,7. É possível observar os aniões carboxilato dos ácidos gordos correspondentes aos derivados ácido da posição *sn-1* não modificado e *sn-2* modificado a  $m/z$  255,3 ( $R_{16:0}COO^-$ ) e 313,4 ( $R_{18:1}COO^-+2O$ ), respetivamente. Também se pode observar o derivado ceto do ácido gordo na posição *sn-2* a  $m/z$  a 295,3. Observam-se os iões fragmento que correspondem as perdas dos ácidos gordos na forma ceto, a  $m/z$  452,4 (perda do *sn-2*) e 510,3 (perda do *sn-1*) e na forma ácido, a  $m/z$  434,4 (perda *sn-2*) e 493,3 (perda *sn-1*). É de realçar a grande perda de água a partir dos iões a  $m/z$  748,7 para os iões a  $m/z$  a 730,6. Este fenómeno corrobora a ideia deste ião corresponder a um produto de oxidação formado pela inserção de oxigénios na forma de derivados hidroperóxidos. Esta perda também se verifica nos aniões carboxilato do ácido gordo modificado ( $313,4-18\text{ Da} = 295,3$ ).

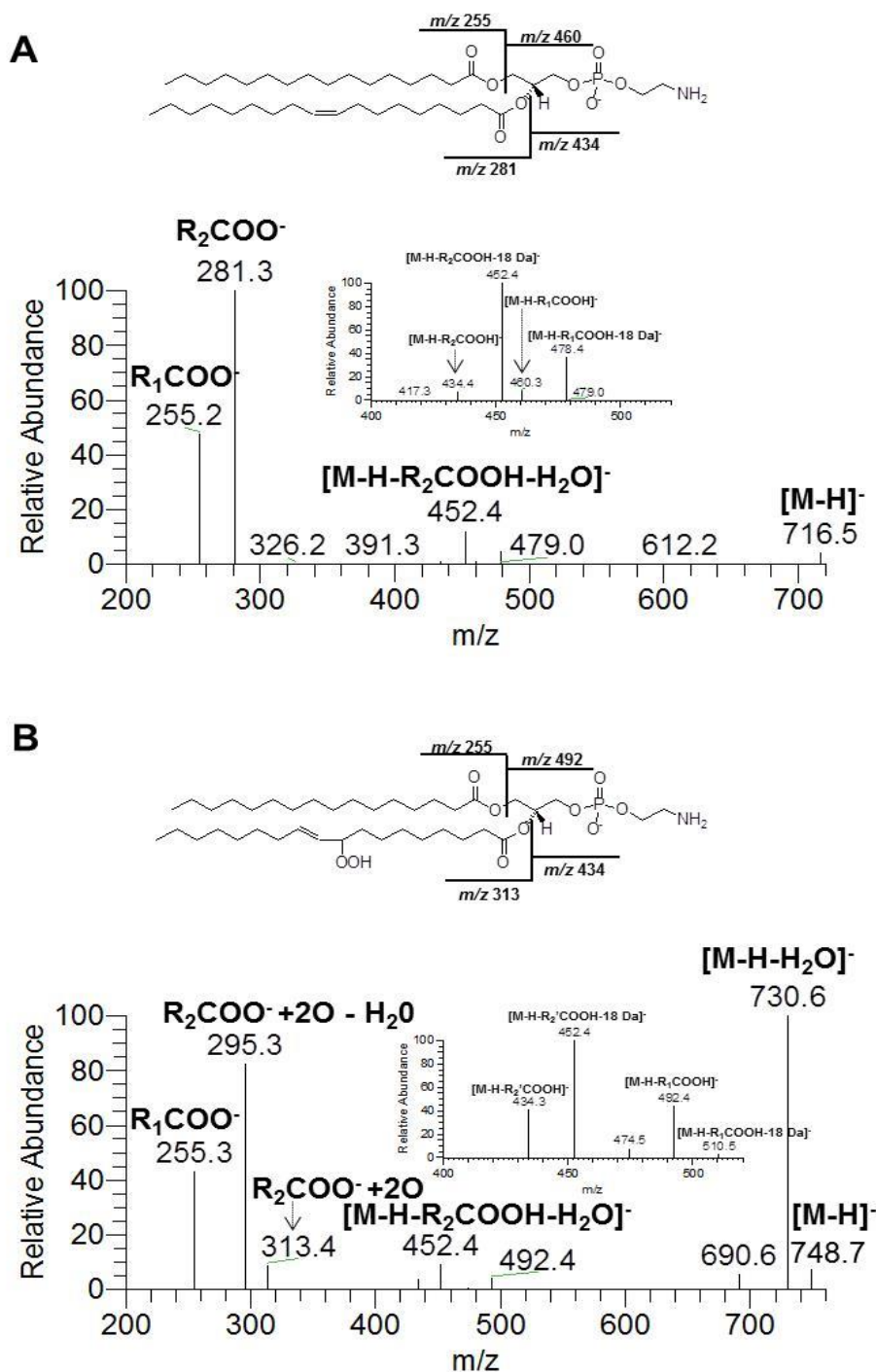


Figura 15 – Espectros ESI-MS/MS do íon  $[M-H]^-$  a  $m/z$  716.5 (A) e a  $m/z$  748.7 (B) de POPE irradiada durante 270 minutos com  $\text{Tri-Py}^+ \text{-Me-PF}$ .

Os espectros de POPE na presença de cada um dos fotossensibilizadores, após irradiação de 90 e 270 minutos, mostram que os íons a  $m/z$  716 (POPE não modificada) e os íons a  $m/z$  748 (POPE + 2O) apresentam variações significativas. Curiosamente, no caso das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub>, observamos uma maior variação nestes íons, ou seja, foram os casos em que observamos uma maior diminuição da POPE não modificada e verificamos um maior aumento da POPE + 2O.

Após análise dos espectros foi determinada a razão entre os íons a  $m/z$  748 (POPE + 2O) e os íons a  $m/z$  716 (POPE não modificada), de forma a avaliar a eficiência dos fotossensibilizadores e verificar se os resultados eram semelhantes aos resultados obtidos por GC-FID para *E. coli* (Figura 16).

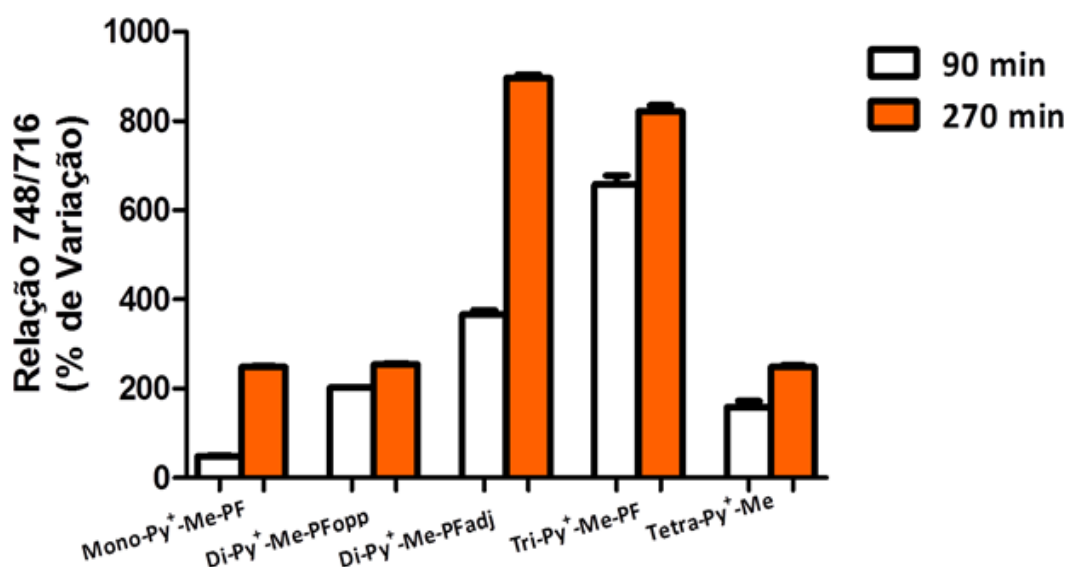


Figura 16 – Percentagem de variação entre a relação de íons a  $m/z$  748/716.

**Tabela 1** – Teste estatístico Bonferroni para comparação de pares de fotossensibilizadores com diferença significativa \*\*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) e n.s. ( $p > 0.05$ ) entre eles, para o tempo 90 e 270 minutos.

| 90 Minutos                             |      | 270 Minutos                            |      |
|--|------|--|------|
| Mono vs Di <sub>adj</sub>              | ***  | Mono vs Di <sub>adj</sub>              | n.s. |
| Mono vs Di <sub>opp</sub>              | ***  | Mono vs Di <sub>opp</sub>              | ***  |
| Mono vs Tri                            | ***  | Mono vs Tri                            | ***  |
| Mono vs Tetra                          | ***  | Mono vs Tetra                          | n.s. |
| Di <sub>adj</sub> vs Di <sub>opp</sub> | ***  | Di <sub>adj</sub> vs Di <sub>opp</sub> | ***  |
| Di <sub>adj</sub> vs Tri               | ***  | Di <sub>adj</sub> vs Tri               | ***  |
| Di <sub>adj</sub> vs Tetra             | n.s. | Di <sub>adj</sub> vs Tetra             | n.s. |
| Di <sub>opp</sub> vs Tri               | ***  | Di <sub>opp</sub> vs Tri               | **   |
| Di <sub>opp</sub> vs Tetra             | ***  | Di <sub>opp</sub> vs Tetra             | ***  |
| Tri vs Tetra                           | ***  | Tri vs Tetra                           | ***  |

Verificou-se que a maior relação foi para as porfirinas Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF aos 270 minutos (Figura 16). As porfirinas Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp.</sub> e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me mostraram uma menor relação. Estes dados estão de acordo com os que foram obtidos em GC-FID para *E.coli*, e com os dados de fotoinativação (dados não publicados). Assim, a análise desta variação mostra ser um bom método para estimar a eficiência dos fotossensibilizadores.

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de porfirina em diferentes tempos de irradiação na quantidade e tipo de produtos de oxidação formados, a POPE foi irradiada na presença de 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  de porfirina durante 90 e 270 minutos (Figura 17 e 18).

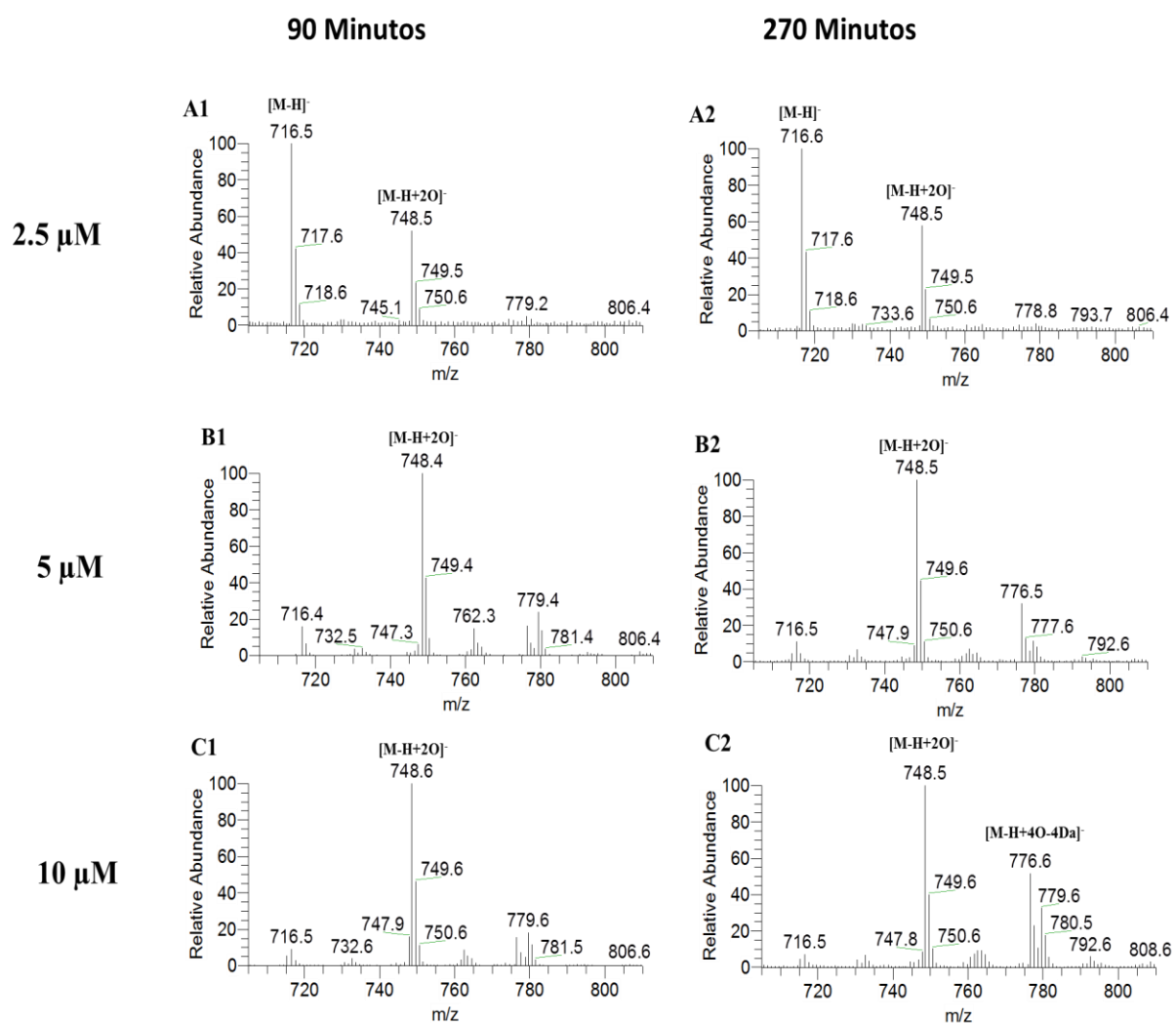


Figura 17 - Espectros ESI-MS de POPE + Tri-Py<sup>+</sup> -Me-PF. [2,5  $\mu\text{M}$ ] - 90 Minutos (A1); [2,5  $\mu\text{M}$ ] - 270 Minutos (A2); [5  $\mu\text{M}$ ] - 90 Minutos (B1); [5  $\mu\text{M}$ ] - 270 Minutos; [10  $\mu\text{M}$ ] - 90 Minutos (C1); [10  $\mu\text{M}$ ] - 270 Minutos (C2).

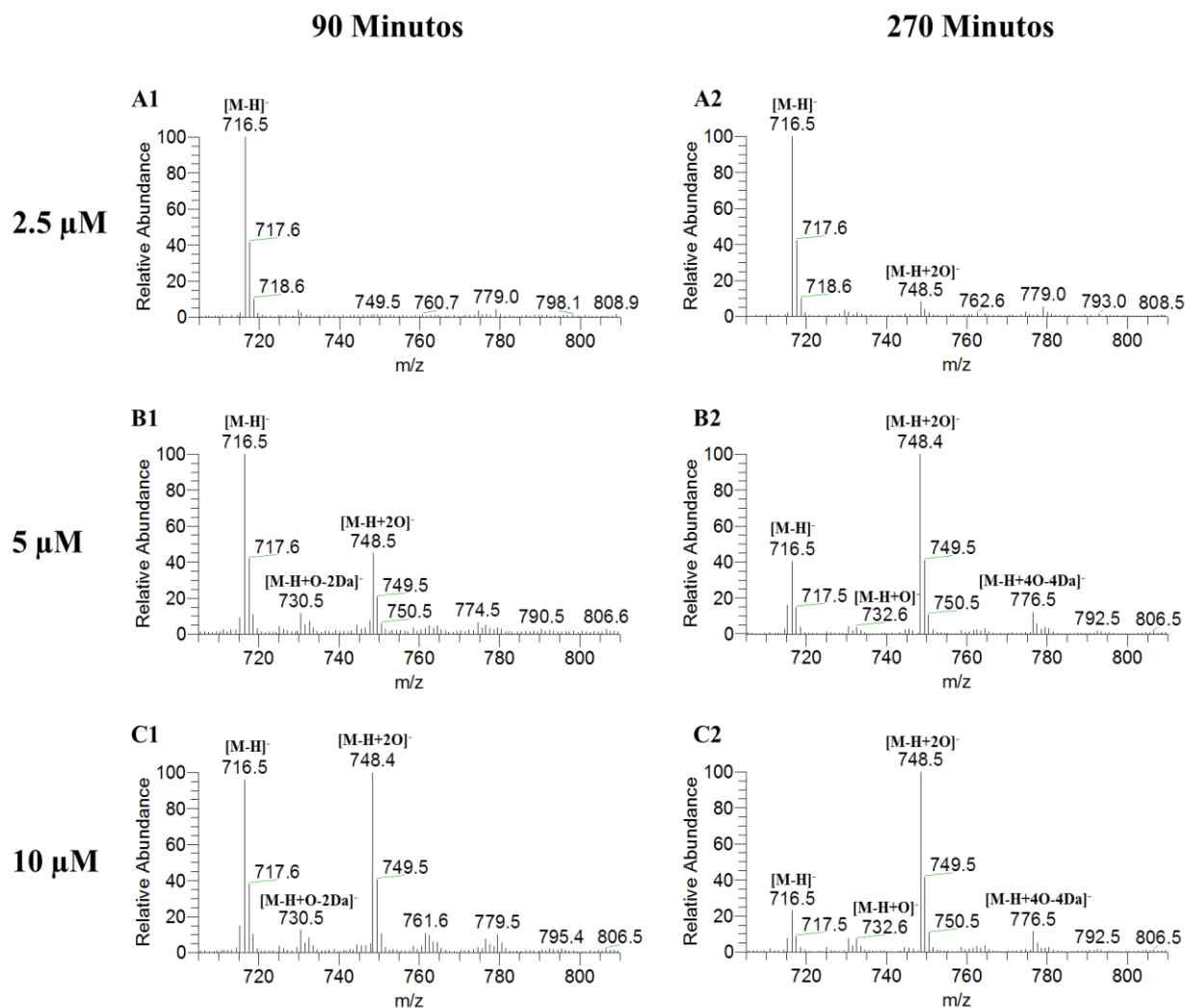


Figura 18 - Espetros ESI-MS de POPE + Mono-Py<sup>+</sup> -Me-PF. [2,5  $\mu\text{M}$ ] - 90 Minutos (A1); [2,5  $\mu\text{M}$ ] - 270 Minutos (A2); [5  $\mu\text{M}$ ] - 90 Minutos (B1); [5  $\mu\text{M}$ ] - 270 Minutos; [10  $\mu\text{M}$ ] - 90 Minutos (C1); [10  $\mu\text{M}$ ] - 270 Minutos (C2).

Os dados mostraram que o tipo de produtos de oxidação é independente da concentração do fotossensibilizador e do tempo de irradiação. No entanto, a quantidade de produtos de oxidação é dependente da concentração de porfirina e do tempo de exposição. Quanto maior a concentração de porfirina e quanto maior o tempo de irradiação maior é a abundância dos produtos formados. Em ambos os tempos e para as três concentrações observou-se sempre a presença de  $[\text{M-H}+2\text{O}]^-$  a  $m/z$  748 que corresponde a derivados hidroperóxido. Estes correspondem aos produtos primários formados durante o processo de fotoinativação, tal como já demonstrado nos ensaios



FOX 2. Uma vez formados, os hidroperóxidos, podem sofrer decomposição e formar outros produtos derivados. Com vista a quantificar os produtos de oxidação formados durante o processo de fotoinativação, determinou-se a relação entre os produtos de oxidação da POPE e a molécula de POPE não modificada, dividindo o valor da intensidade dos produtos oxidados pela intensidade do não modificado (Figura 19).

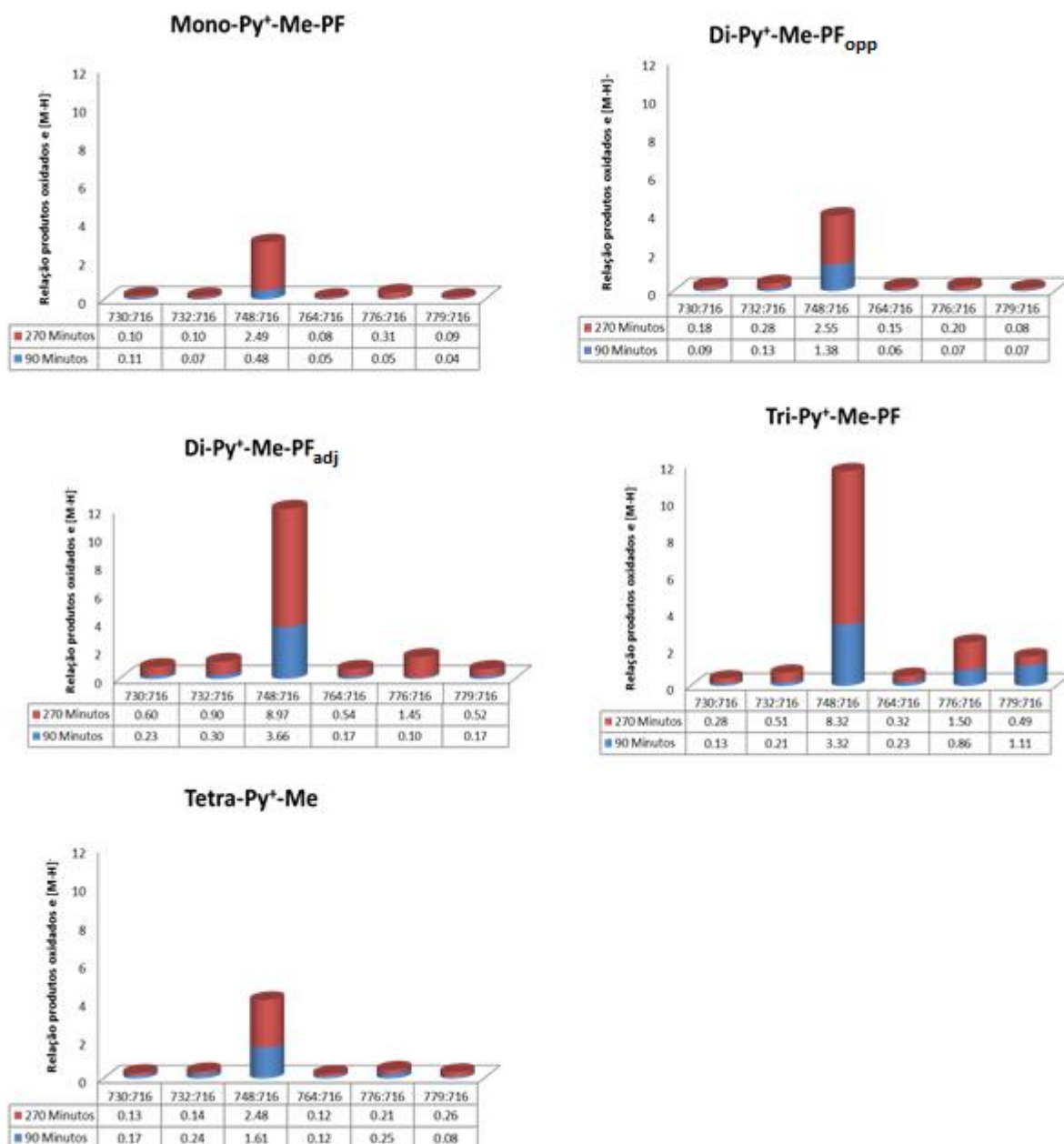


Figura 19 – Relação entre  $[M-H]^-$  e os produtos de oxidação formados após irradiação com diferentes fotossensibilizadores durante 90 e 270 minutos a uma concentração igual a 5  $\mu M$ .

A maior relação entre os dois compostos verificou-se no tempo mais elevado, isto é, aos 270 minutos, para todas as porfirinas. A maior relação entre os produtos de POPE oxidados e POPE não modificada corresponde à porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>opp</sub>. Verificou-se também que o íão a m/z 748 (POPE + 20) é aquele que mais se forma, representando o mais abundante no processo de fotossensibilização. Deste modo, foi determinada a relação de percentagem entre [M-H+20]<sup>-</sup> e [M-H]<sup>-</sup> de forma a confirmar qual das porfirinas apresenta uma maior eficiência de inativação.

Para a concentração de 2,5 µM (Figura 20) verificou-se que o íão a m/z 716, que corresponde à molécula de POPE não modificada, é para todas as porfirinas sempre superior ao íão a m/z 748. Significa que com esta concentração de porfirina os valores de oxidação ainda não são muito elevados e que ainda existe uma grande percentagem de POPE que ainda não foi modificada. No entanto, aos 270 minutos a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj</sub> já apresentam íões m/z a 748 na ordem dos 39% e 58%, respetivamente, indicando que já apresentam alguma eficiência a esta concentração.

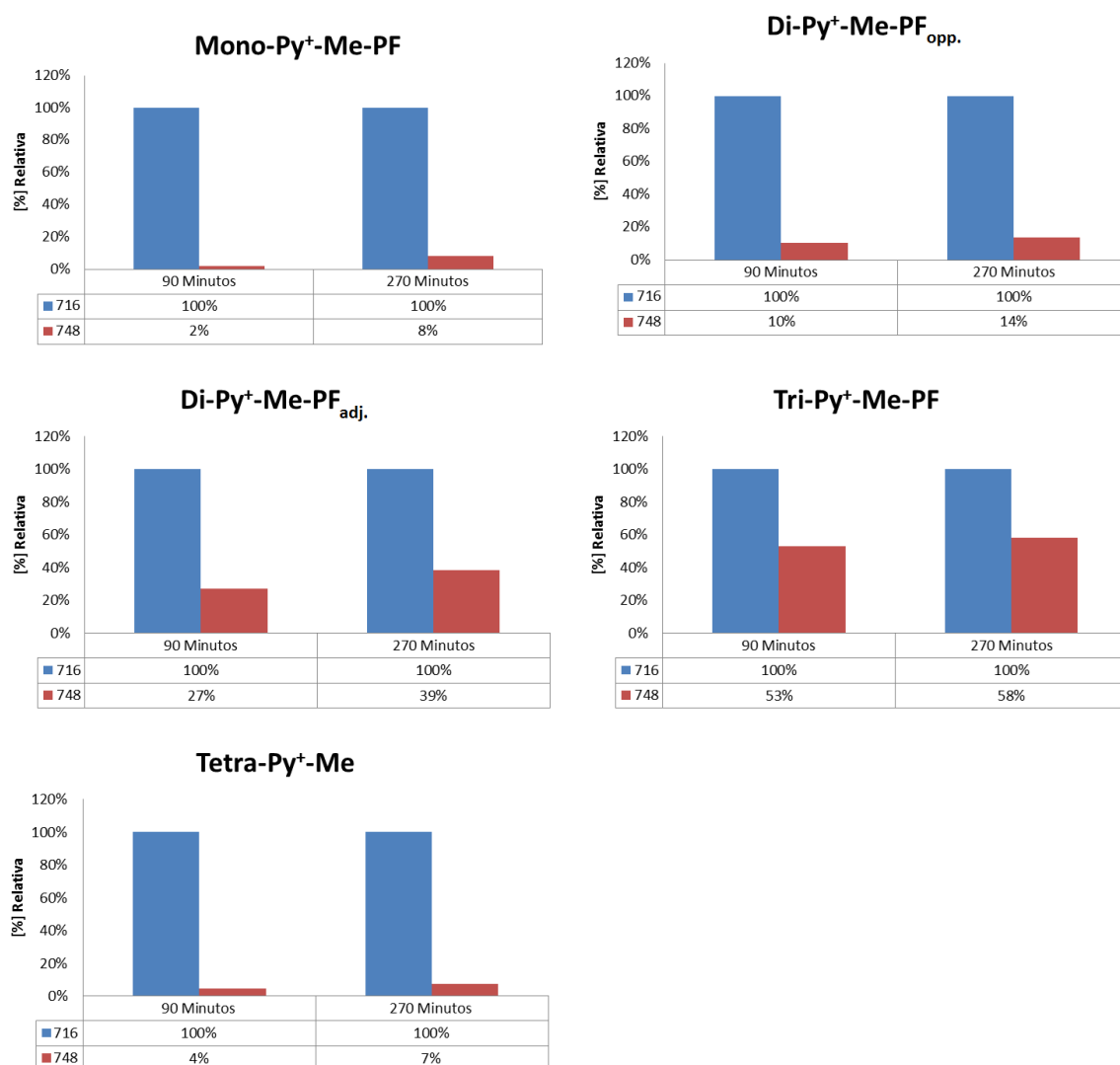


Figura 20 - Abundância relativa dos íons  $[M-H]^+$  (716) e  $[M-H+2O]^+$  (748) observados nos espectros ESI-MS na presença de 2,5  $\mu\text{M}$  de porfirina.

Na concentração *standard* utilizada nos ensaios de fotoinativação de *E. coli* (5  $\mu\text{M}$ ), a percentagem de íons a  $m/z$  748 foi sempre superior à percentagem de íons a  $m/z$  716 para todas as porfirinas em todos os tempos, exceto para a porfirina Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF aos 90 minutos (Figura 21).

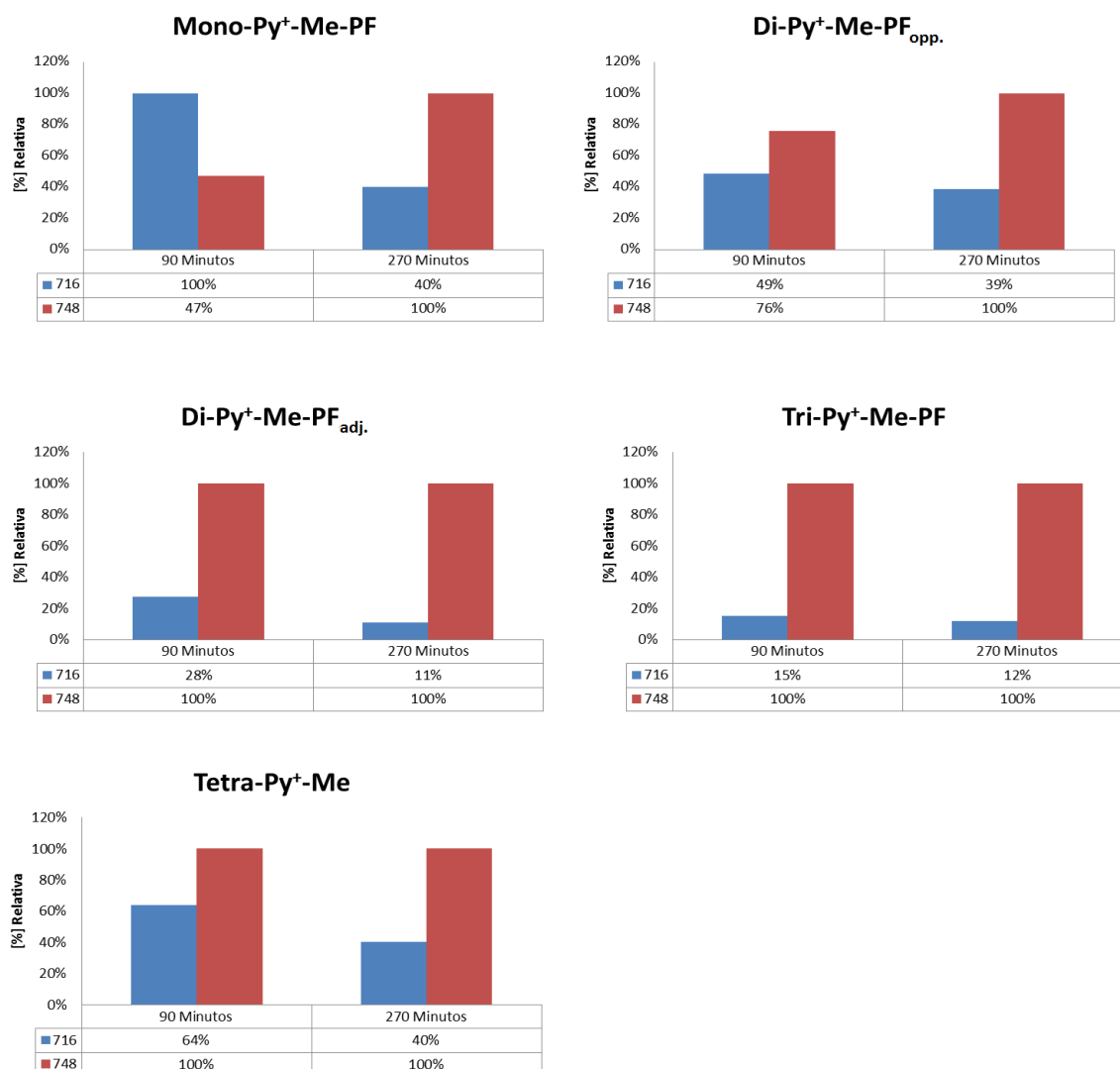


Figura 21 - Abundância relativa dos iões  $[M-H]^+$  (716) e  $[M-H+20]^+$  (748) observados nos espectros de ESI-MS na presença de 5  $\mu$ M de porfirina.

Aos 270 minutos os iões a  $m/z$  748 atingiram o valor máximo de 100% para todas as porfirinas. No entanto, é de realçar que já aos 90 minutos as porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me atingiram a percentagem máxima. Embora o FS Tetra-Py<sup>+</sup>-Me atinja os 100% de iões a  $m/z$  748 aos 90 minutos a sua percentagem de iões a  $m/z$  716 é muito mais elevada do que para as outras duas, o que indica que a esta concentração a eficiência de inativação é maior para os FS Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub>

À concentração de 10  $\mu\text{M}$  a percentagem de iões a  $m/z$  748 atingiu valores de 100% em ambos os tempos e a percentagem de iões a  $m/z$  716 foi significativamente menor do que aquela encontrada para as duas concentrações mais baixas (Figura 22).

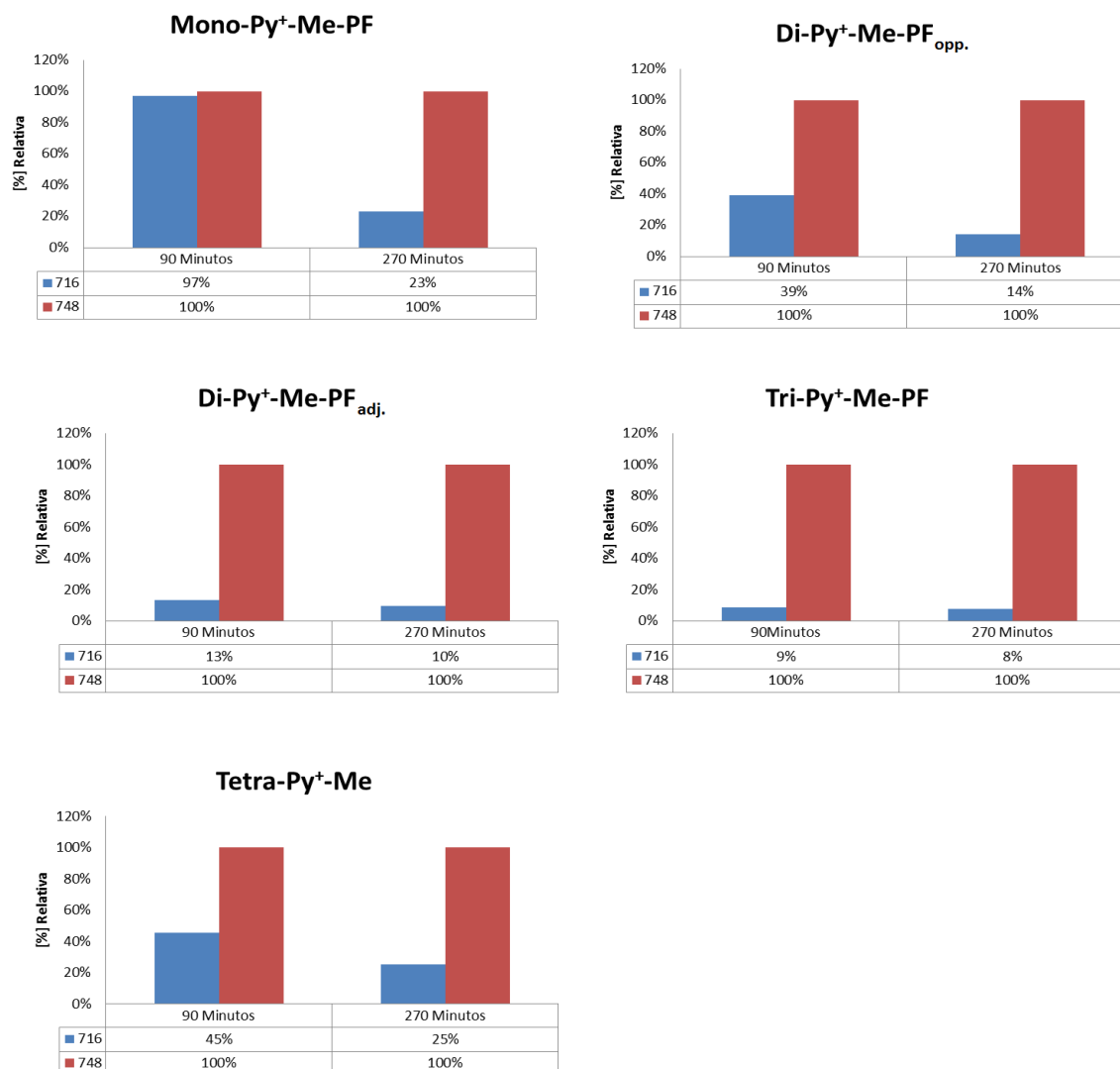


Figura 22 – Abundância relativa dos iões  $[\text{M-H}]^-$  (716) e  $[\text{M-H}+ 2\text{O}]^-$  (748) observados nos espectros ESI-MS na presença de 10  $\mu\text{M}$  de porfirina.

A percentagem de iões a  $m/z$  716 foi mais baixa para os FS Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj</sub>, o que indica que após fotossensibilização com estas duas porfirinas a molécula de POPE não modificada apresenta uma percentagem muito baixa, confirmando que estes dois FS são os mais eficientes. Estes dados asseguram, mais uma vez, que a quantidade de produtos de oxidação, e por conseguinte a extensão do dano oxidativo nos lípidos membranares, depende da concentração de porfirina e do tempo de irradiação.

## **IV. Conclusão**





Para avaliar o efeito da carga de cinco porfirinas catiónicas, utilizadas como fotossensibilizadores, na foto-oxidação dos fosfolípidos de *E. coli* e para avaliar se a oxidação lipídica é um mecanismo importante na inativação bacteriana foram utilizados dois métodos de análise quantitativos, FOX 2 e GC-FID.

Observou-se que o primeiro método, apesar de permitir detetar a oxidação lipídica, não se correlacionou com os valores obtidos com a inativação celular. A quantificação de ácidos gordos insaturados por GC-FID correlacionou-se com os resultados dos estudos de viabilidade bacteriana, aumentando a eficiência dos FS na inativação de *E. coli* da seguinte forma: Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF < Di-Py+-Me-PF<sub>opp.</sub> < Tetra-Py<sup>+</sup>-Me < Di-Py<sup>+</sup>-Me-PF<sub>adj.</sub> < Tri-Py+-Me-PF, tal como observado para os ensaios de viabilidade celular.

O sistema modelo, lipossomas de POPE, associado à deteção de produtos formados por ESI-MS e ESI-MS/MS após terapia fotodinâmica foi monitorizado, e mostrou ser um método simples e rápido para avaliar a eficiência de fotossensibilizadores. Foram identificados produtos de oxidação de cadeia longa provenientes da oxidação de ácidos gordos insaturados, nomeadamente derivados ceto, hidroxilo e hidroperóxidos. Os hidroperóxidos lipídicos são os produtos mais abundantemente formados durante o processo de fotossensibilização. Avaliando os produtos formados e a sua variação é proposto um método quantitativo baseado na razão dos iões a m/z 716 e 748, correspondentes, respetivamente, ao POPE não modificado e ao seu hidroperóxido (POPE + 2O). A variação destes iões é dependente do fotossensibilizador e correlaciona-se com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular de *E. coli*. Este modelo permitiu ainda verificar que a quantidade de produtos de oxidação é dependente da concentração de porfirina e do tempo de exposição.

Este trabalho vem reforçar o facto dos lípidos da membrana de *E. coli* serem um alvo importante da terapia fotodinâmica e que os sistemas modelo baseados em lipossomas são métodos rápidos e simples que podem ser usados como métodos de “screening” para avaliar a eficiência de FS antes de se proceder com os estudos mais complexos em bactérias.



## **V. Bibliografia**



- Allison, R. R., Mota, H. C., & Sibata, C. H. (2004). Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 263–277.
- Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., & Tomé, A. C. (2011). Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents, 83–160.
- Almeida, A., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Alves, E., Costa, L., & Faustino, M. A. F. (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine drugs*, 7, 268–313.
- Alves, E., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Mendo, S., Adelaide, A. (2008). Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35(11), 1447–1454.
- Alves, E., Costa, L., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Almeida, A. (2009). Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC microbiology*, 9(1), 70.
- Alves, E., Faustino, M. A., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, A., Gomes, N. C., Almeida, A. (2013a). Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria by cationic porphyrins. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(14), 4311–8.
- Alves, E., Melo, T., Simões, C., Faustino, M. A., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A., Cunha, A., Gomes, N. C., Domingues, P., Domingues, M. R., Almeida, A. (2013b). Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(14), 1607–1618.
- Alves, E., Santos, N., Melo, T., Maciel, E., Dória, M. L., Faustino, M. A., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A., Cunha, A., Helguero, L. A., Domingues, P., Domingues, M. R. (2013c). Photodynamic oxidation of *Escherichia coli* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(23), 2717–2728.
- Barbosa, C. (1995). Desenvolvimento e Caracterização de Formulações Lipossômicas de Monofosfato de Vidarabina para o Tratamento da Hepatite B Crónica. *Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.*, 19–53.
- Beale, S. I. (2009). Chapter 20 - Biosynthesis of Chlorophylls and Hemes. In *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*, 731–798.
- Bertoloni, G., Rossi, F., Valduga, G., Jori, G., & Van Lier, J. (1990). Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 59, 149–155.

- Bonnett, R., Krysteva, M. A., Lalov, I. G., & Artarsky, S. V. (2006). Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. *Water Research*, 40(6), 1269–1275.
- Boyle-Vavra, S., Labischinski, H., Ebert, C. C., Ehler, K., & Daum, R. S. (2001). A Spectrum of Changes Occurs in Peptidoglycan Composition of Glycopeptide-Intermediate Clinical Staphylococcus aureus Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 280–287.
- Bulletin of the World Health Organization. (2011). Race against time to develop new antibiotics. *World Health Organization*, 89, 88–89.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3(1), 3–8.
- Caminos, D. A., & Durantini, E. N. (2006a). Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(12), 4253–4259.
- Caminos, D. A., Spesia, M. B., & Durantini, E. N. (2006b). Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-*N,N,N*-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 5(1), 56–65.
- Caminos, D. A., Spesia, M. B., Pons, P., & Durantini, E. N. (2008). Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N*-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photochemical photobiological sciences Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 7, 1071–1078.
- Carvalho, C. M., Gomes, A. T., Fernandes, S. C., Prata, A. C., Almeida, M. A., Cunha, M. A., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A., Lin, Z., Rainho, J.P., Rocha, J. (2007). Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: bacterial beta-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J Photochem Photobiol B*, 88(2-3), 112–118.
- Carvalho, C. M., Alves, E., Costa, L., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Almeida, A., Cunha, A., Lin, Z., Rocha, J. (2010). Functional cationic nanomagnet-porphyrin hybrids for the photoinactivation of microorganisms. *ACS nano*, 4, 7133–7140.
- Castano, A., Demidova, T., & Hamblin, M. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, 279–293.
- Christensen, H., Garton, N. J., Horobin, R. W., Minnikin, D. E., & Barer, M. R. (1999). Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes. *Molecular Microbiology*, 31, 1561–1572.

- Costa, L., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, A., & Almeida, A. (2012). Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 4(7), 1034–74.
- Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of bacteriology*, 171(4), 2188–94.
- De Rosa, F. S., & Bentley, M. V. (2000). Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm Res.*, 17(12), 1447–55.
- Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation, 49(6), 2329–2335.
- DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 351–371.
- Dougherty, T J, Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbely, M., Moan, J., Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889–905.
- Dougherty, T J, Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R., & Boyle, D. G. (1975). Photoradiation Therapy. II. Cure of Animal Tumors With Hematoporphyrin and Light. *Journal of the National Cancer Institute* , 55 (1 ), 115–121.
- Dougherty, Thomas J, Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., & Mittleman, A. (1978). Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Research* , 38 (8 ), 2628–2635.
- Dowhan, W. (2013). A retrospective: Use of *Escherichia coli* as a vehicle to study phospholipid synthesis and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(3), 471–94.
- Dowhan, W., Mileykovskaya, E., & Bogdanov, M. (2004). Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 19–39.
- Ehrenberg, B., Malik, Z., Nitzan, Y., Ladan, H., Johnson, F., Hemmi, G., & Sessler, J. (1993). The binding and photosensitization effects of tetrabenzoporphyrins and texaphyrin in bacterial cells. *Lasers In Medical Science*, 8(3), 197–203.
- Ergaieg, K., Chevanne, M., Cillard, J., & Seux, R. (2008). Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Solar Energy*, 82(12), 1107–1117.
- Finsen, N. (1901). Phototherapy. *London:Arnold*.
- Fishov, I., & Woldringh, C. L. (1999). Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 32, 1166–1172.
- Foot, C. S. (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science* 162, 963–970.

- Foote, Christopher S. (1991). Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, 54(5), 659.
- Girotti, a W. (2001). Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 63(1-3), 103–13.
- Girotti, A. W. (1990). Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochemistry and Photobiology*, 51, 497–509.
- Hader, D. P., & Jori, G. (2003). *Photodynamic therapy. In Comprehensive series in photochemistry & photobiology Vol. 2. (Europeans)*.
- Harder, K. J., Nikaido, H., & Matsushashi, M. (1981). Mutants of *Escherichia coli* That Are Resistant to Certain Beta-Lactam Compounds Lack the ompF Porin Mutants of *Escherichia coli* That Are Resistant to Certain Beta-Lactam Compounds Lack the ompF Porin.
- Hasin, M., & Kennedy, E. P. (1984). Turnover of fatty acids in the 1-position of phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 6188–6194.
- Hsu, F. F., & Turk, J. (2006). Characterization of cardiolipin from *Escherichia coli* by electrospray ionization with multiple stage quadrupole ion-trap mass spectrometric analysis of  $[M - 2H + Na]^+$  ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17, 420–429.
- Huang, M. D. (2006). Photodynamic therapy in China: Over 25 years of unique clinical experience Part One—History and domestic photosensitizers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 3, 3–10.
- Jackowski, S., & Rock, C. O. (1986). Transfer of fatty acids from the 1-position of phosphatidylethanolamine to the major outer membrane lipoprotein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 11328–11333.
- Jemli, M., Alouini, Z., Sabbahi, S., & Gueddari, M. (2002). Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. *Journal of Environmental Monitoring*, 4(4), 511–516.
- Jori, G., & Brown, S. B. (2004). Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 3(5), 403–5.
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppelotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., Roncucci, G. (2001). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 34, 18–24.
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2008). Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British journal of pharmacology*, 154(1), 1–3.



- Josefsen, L. B., Boyle, R. W. (2012). Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. *Theranostics*, 2(9):916-966.
- Kadish, M. K., Smith, M. K., & Guillard, R. (2003). *The Porphyrin Handbook Volume 6 / Applications: Past, Present and Futures* (pp. 44–128).
- Kanfer, J., & Kennedy, E. P. (1964). Metabolism and Function of Bacterial Lipids. II. Biosynthesis of Phospholipids in Escherichia Coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 239:1720–1726.
- Kappus, H. (1985). Lipid peroxidation: mechanisms, enzymology, and biological relevance, in: H. Sies (Ed.). *Oxidative Stress, Academic Press, New York*, 273–310.
- Kennedy, J. C., Pottier, R. H., & Pross, D. C. (1990). Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6(1–2), 143–148.
- Kim, J., Rodriguez, M. E., Oleinick, N. L., & Anderson, V. E. (2010). Photo-oxidation of cardiolipin and cytochrome c with bilayer-embedded Pc 4. *Free radical biology & medicine*, 49(5), 718–25.
- Layre, E., & Moody, D. B. (2013). Lipidomic profiling of model organisms and the world ' s major pathogens. *Biochimie*, 95(1), 109–115.
- Lipson, R. L., Baldes, E. J. (1961). Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 9, 42–623.
- Loh, C. S., MacRobert, A. J., Bedwell, J., Regula, J., Krasner, N., & Bown, S. G. (1993). Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *British journal of cancer*, 68(1), 41–51.
- Makowski, A., & Wardas, W. (2001). Photocatalytic degradation of toxins secreted to water by cyanobacteria and unicellular algae and photocatalytic degradation of the cells of selected microorganisms, 25(1), 19–25.
- Manso, C. (1977). Bioquímica humana - 2<sup>o</sup> Edition. In *Fundação calouste Gulbenkian, Lisboa*.
- Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A., & Hara, H. (2006). Lipid domains in bacterial membranes. *Molecular microbiology*, 61(5), 1110–7.
- Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villanueva, A., & Jori, G. (1996). Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 32(3), 153–7.
- Mitton, D., Ackroyd, M. D. (2008). A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 5, 103–111.

- Motta, V. T. (2009). Lípidos e Membranas. In *Bioquímica Básica* (pp. 213–239).
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry. Biological Membranes* (Vol. 4th editio, p. 1100).
- Nitzan, Y., & Ashkenazi, H. (2001). Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. *Current Microbiology*, 42, 408–414.
- O’Riordan, K., Akilov, O. E., & Hasan, T. (2005). The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(4), 247–262.
- Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39(1), 1–18.
- Polle, A., Krings, B., & Rennenberg, H. (1989). Superoxide Dismutase Activity in Needles of Norwegian Spruce Trees (*Picea abies* L.) 1. *Plant Physiology*, 90, 1310–1315.
- Raab, O. (1900). Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol*, 39:524–46.
- Richardson, S. D., Thruston A. D. Jr., Caughran, T. V, Chen, P. H., Collette, T. W., Schenck, K. M., Lykins, B. W. Jr., Rav-Acha, C., Glezer, V. (2000). Identification of new drinking water disinfection by-products from ozone, chlorine dioxide, chloramine, and chlorine. *Environmental Protection*, 123, 95–102.
- Rodriguez, M. E., Kim, J., Delos Santos, G. B., Azizuddin, K., Berlin, J., Anderson, V. E., Kenney, M. E., Oleinick, N. L. (2010). Binding to and photo-oxidation of cardiolipin by the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Journal of biomedical optics*, 15(5), 051604.
- Rojas-Valencia, M. N., Orta-de-Velásquez, M. T., Vaca-Mier, M., & Franco, V. (2004). Ozonation by-products issued from the destruction of microorganisms present in wastewaters treated for reuse. *Water Science and Technology*, 50, 187–193.
- Roland, K. L., Esther, C. R., & Spitznagel, J. K. (1994). Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, from *Salmonella typhimurium* that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies. *Journal of Bacteriology*, 176 (12), 3589–3597.
- Salmon-Divon, M., Nitzan, Y., & Malik, Z. (2004). Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(*N*-methylpyridyl)porphine. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 3, 423–429.
- Shapiro, L., McAdams, H. H., & Losick, R. (2002). Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science*, 298, 1942–1946.

- Sheers, H., & Kats, J. J. (1975). Porphyrins and Metalloporphyrins. *Elsevier Publishing Company, Amsterdam*.
- Spesia, M. B., Lazzeri, D., Pascual, L., Rovera, M., & Durantini, E. N. (2005). Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44(3), 289–295.
- Spesia, M. B., Caminos, D. A., Pons, P., & Durantini, E. N. (2009). Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by a tetracationic zinc(II) phthalocyanine derivative. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 6, 52–61.
- Stadtländer, C. T. K. H. (2013). Book review. *Journal of epidemiology and community health*, 67(10), 892–3.
- Tanielian, C., Mechin, R., Seghrouchni, R., & Schweitzer, C. (2000). Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 71, 12–19.
- Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. a, Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, A., Gomes, N. C., Aves, E., Almeida, A. (2010). Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Marine drugs*, 8(1), 91–105.
- Tyrrell, J., Campbell, S. M., & Curnow, A. (2011). Monitoring the accumulation and dissipation of the photosensitizer protoporphyrin IX during standard dermatological methyl-aminolevulinate photodynamic therapy utilizing non-invasive fluorescence imaging and quantification. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 8, 30–38.
- Valenzano, D. P. (1987). Photomodification of Biological Membranes with Emphasis on Singlet Oxygen Mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, 46, 147–160.
- Vance, D. E., & Vance, J. E. (2008). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. *Biochemistry of lipids lipoproteins and membranes* (Vol. 5th editio, p. 631).
- Vereb, G., Szöllosi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann. T. A., Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8053–8.
- Von Trappeiner, H., & Jesionek, A. (1903). Therapeutische Versuche mil fluoreszierenden Stoffen. *Med Worchenschr*, (47): 2042–4.
- Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Wańczyk, M., Bojarczuk, K., Golab, J. (2011). Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules*, 16(12), 4140–4164.
- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42 (1), 13–28.

- Winckler, K. D. (2007). Special section: focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT). *Journal of photochemistry and photobiology. Biology*, 86(1), 43–4.
- Wöhrle, D. (1997). Book Review: The colors of life: an introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 1(4), 395–396.
- Yin, H., & Porter, N. A. (2003). Specificity of the ferrous oxidation of xylenol orange assay: analysis of autoxidation products of cholesteryl arachidonate. *Analytical biochemistry*, 313, 319–326.
- Yoshimune, K., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2002). Sequence and function of the aas gene in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250, 396–401.
- Zhao, B., & Yu-Ying He. (2010). Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 10(11), 1797–1809.